

VERTEILUNG VON ^{14}C -LINDAN AUF BLUT UND
ORGANE DER RATTE
UND STOFFWECHSELVERÄNDERUNGEN
BEI RATTE UND MAUS UNTER LINDANEINFLUSS

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

vorgelegt von
Renate Bieniok
geb. in Kiel

Mainz 1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

VERTEILUNG VON ^{14}C -LINDAN AUF BLUT UND
ORGANE AUF SATTE
UND STOFFWECHSEL CHARAKTERISTIKEN
AUF SATTE UND SAUG WÄHREND LINDANINHALT

VERGLEICH
ZUR VERTEILUNG DES LINDAN
AUF SATTE UND STOFFWECHSEL
ZUR VERTEILUNG DES LINDAN
AUF SATTE UND STOFFWECHSEL
ZUR VERTEILUNG DES LINDAN
AUF SATTE UND STOFFWECHSEL

VERGLEICH
ZUR VERTEILUNG DES LINDAN
AUF SATTE UND STOFFWECHSEL
ZUR VERTEILUNG DES LINDAN
AUF SATTE UND STOFFWECHSEL

VERGLEICH

VERTEILUNG VON ^{14}C -LINDAN AUF BLUT UND
ORGANE DER RATTE
UND STOFFWECHSELVERÄNDERUNGEN
BEI RATTE UND MAUS UNTER LINDANEINFLUSS

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

vorgelegt von
Renate Bieniok
geb. in Kiel

Mainz 1979

1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Urich
2. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Beyermann

Tag der mündlichen Prüfung: 4.7.1979

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Zoologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. K. Urich angefertigt.

Für die Anregung zu diesen Untersuchungen und für die persönliche Anteilnahme am Fortgang und an der kritischen Abfassung dieser Arbeit fühle ich mich Herrn Prof. Urich zu Dank verpflichtet.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts möchte ich mich für die Diskussions- und Hilfsbereitschaft bedanken, besonders bei Herrn Dr. G. Frank für die tatkräftige Unterstützung bei der Auftrennung der Aminosäuren.





Abkürzungen der Aminosäuren

Cys	Cystein
Asp	Asparaginsäure
Met	Methionin
Thr	Threonin
Ser	Serin
Glu	Glutaminsäure
Pro	Prolin
Gly	Glycin
Ala	Alanin
Val	Valin
Ile	Isoleucin
Leu	Leucin
Tyr	Tyrosin
Phe	Phenylalanin
His	Histidin
Lys	Lysin
Arg	Arginin

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

2. MATERIAL UND METHODEN

- 2.1 Versuchstiere
- 2.2 Chemikalien und Geräte
 - 2.2.1 Untersuchter Schadstoff
 - 2.2.2 Radioaktive Substanzen
 - 2.2.3 Chemikalien und technische Apparate
- 2.3 Bestimmung der Blutspiegelkurve
- 2.4 Versuchsablauf zum Nachweis der Organverteilung
- 2.5 Messung von stationären Metabolitkonzentrationen
 - 2.5.1 Probenaufbereitung
 - 2.5.2 Nachweismethoden
- 2.6 Bestimmung des oxidativen Lactatabbaus
- 2.7 Versuchstechnik zur Bestimmung des Glucose-Stoffwechsels unter Lindanbelastung
- 2.8 Messung von Enzymaktivitäten in Organproben
 - 2.8.1 Cytochromoxidase und Succinatdehydrogenase in Leber und Muskel der Ratte
 - 2.8.2 Acetylcholinesterase im Gehirnhomogenat von Mäusen
- 2.9 Mathematische Methoden zur Statistik und Kinetik

3. ERGEBNISSE

- 3.1 Kinetik des Lindans im Blut der Ratte
- 3.2 Lindanverteilung nach intravenöser Injektion von C14-Lindan auf die Organe der Ratte
- 3.3 Veränderungen von stationären Metabolitkonzentrationen unter Lindaneinfluß in Leber und Muskel

- 3.4 Oxidativer Abbau des Lactats unter Lindanbelastung
- 3.5 Einfluß einer subletalen Lindangabe auf das Schicksal von C14-markierter Glucose
- 3.6 Lindanwirkung auf die Aktivität der respiratorischen Enzyme Cytochromoxidase und Succinatdehydrogenase in Leber und Muskel
- 3.7 Lindaneffekt auf die Aktivität der Acetylcholinesterase im Gehirn von Mäusen

4. DISKUSSION

5. ZUSAMMENFASSUNG

6. LITERATUR

1. EINLEITUNG

Lindan gehört wie DDT zur Gruppe der Chlorkohlenwasserstoffe mit insektizider Wirkung. Benannt wurde es nach dem Chemiker VAN DER LINDEN, der das γ -Isomere des sechsfach chlorierten zyklischen Hexans 1912 entdeckte. Seit 1949 wird es weltweit zur Schädlingsbekämpfung und zum Pflanzenschutz eingesetzt.

Ebenso wie DDT wird Lindan bevorzugt im Fettgewebe eines Organismus gebunden, bildet dort jedoch im Gegensatz zum DDT kein "deep compartment", sondern wird innerhalb von 1 bis 3 Wochen abgebaut und vollständig ausgeschieden (KORANSKY & PORTIG, 1963; SEIDLER et al., 1975). Die Anreicherung in den einzelnen Gliedern einer Nahrungskette erreicht daher nie das Ausmaß der DDT-Anreicherung, so daß die Belastung für die Umwelt relativ gering bleibt (SIEPER, 1973).

Ein weit größeres Umweltproblem liegt in der Beseitigung der Rückstände aus der Lindanproduktion. Bis in die siebziger Jahre wurde Lindan aus dem Isomerengemisch des technischen Hexachlorcyclohexans gewonnen. Die maximale Lindanausbeute beträgt bei diesem Verfahren rund 15 Prozent, d.h. bei der Herstellung von einer Tonne Lindan fielen ungefähr sieben Tonnen Rückstände an, die zum größten Teil nicht weiterverwertbar waren und abgelagert werden mußten (DEMOZAY & MARECHAL, 1973). Etwa 12 Prozent dieser Rückstände bestanden aus dem β -Isomeren, das bei chronischer Anwendung wegen seiner langen Verweildauer im Organismus wesentlich toxischer als das Lindan ist (DAVIDOW & FRAWLEY, 1951). Bei unsachgemäßer Ablagerung besteht die Möglichkeit, daß es in die Nahrungskette

gelangt und dadurch schwerwiegende Umweltschäden verursacht. Erst vor kurzem erregte ein solcher Fall öffentliches Interesse, als in der Milch aus der Umgebung einer Hexachlorcyclohexan-Deponie Pestizidrückstände in einer nicht mehr tolerablen Konzentration nachgewiesen wurden.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach den Symptomen einer akuten Insektizidvergiftung beim Menschen und dem Wirkungsmechanismus des Insektizides beinahe von selbst. Die Frage nach dem äußeren Vergiftungsbild kann durch Unfälle, bei denen Personen versehentlich ein Insektizid eingenommen haben, und durch gezielte Versuche mit Labortieren beantwortet werden. Der kausale Zusammenhang mit dem biologischen Angriffspunkt konnte jedoch nur in wenigen Fällen aufgeklärt werden. Für die Insektizide aus der Gruppe der Phosphorsäureester beispielsweise konnte nachgewiesen werden, daß ihre toxische Wirkung auf einer irreversiblen Blockierung der Cholinesterasen beruht (DU BOIS & MANGUN, 1947; CHADWICK & HILL, 1947; METCALF & MARCH, 1950).

Die chlorierten Kohlenwasserstoffe gehören zu den Insektiziden, deren biologischer Angriffspunkt noch nicht bekannt ist. Eine akute Lindanvergiftung beim Menschen äußert sich in Übelkeit, Erbrechen und schweren Krampfanfällen, die ungefähr 30 Minuten nach oraler Aufnahme des Wirkstoffes auftreten und sich mehrere Stunden lang wiederholen können (MUNK & NANTEL, 1977). Versuche von JOY (1976) und Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit an Laborsäugern haben gezeigt, daß bei intravenöser Applikation einer toxischen Lindandosis die Krampfanfälle schon innerhalb der ersten 5 Minuten p.a. auftreten.

Daraus kann man schließen, daß Lindan unmittelbar nach der Injektion seinen Wirkungsort erreicht. Da die Vergiftungserscheinungen eine starke Ähnlichkeit mit den Symptomen einer Cholinesterasehemmung aufweisen, wurde auch beim Lindan, neben verschiedenen anderen Theorien, der primäre Angriffspunkt in den Cholinesterasen vermutet (DALLEMAGNE, PHILIPPOT & GERNAY, 1961). Bis jetzt allerdings konnte der Nachweis einer Enzyminaktivierung in vitro noch nicht erbracht werden, obwohl bei Versuchen mit Insekten nach Injektion von 20 µg Lindan ein beachtlicher Anstieg des Acetylcholingehaltes festgestellt werden konnte (WALLER & LEWIS, 1961)✓

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den biologischen Angriffspunkt des Lindans an Stoffwechselwirkungen zu erkennen und eine Aufklärung des Wirkungsmechanismus zu versuchen.

Der erste Schritt der pharmakologischen Wirkung einer in den Organismus gebrachten Substanz ist die Bindung des Pharmakons an einen spezifischen Rezeptor (EBERLEIN, 1978). Als Primärwirkung treten molekularbiologische Prozesse auf, die zu einer veränderten physiologischen Situation innerhalb der Zellen des Zielorgans führen, wodurch letztlich die pharmakologischen oder toxischen Symptome des Wirkstoffes ausgelöst werden. Der Eingriff eines Pharmakons in den Funktionszustand der Zelle kann sich in den stationären Konzentrationen von Stoffwechselprodukten widerspiegeln. Treten meßbare Änderungen in den stationären Metabolitkonzentrationen auf, so kann man durch Rückschlüsse über die Stoffwechselwege, die zu dieser veränderten Situation geführt haben könnten, den primären Angriffspunkt des Pharmakons ermitteln. Je kompli-

zierter und verzweigter die biochemischen Vorgänge jedoch sind, desto schwieriger wird es, den Prozeß zurückzuverfolgen.

Eine andere Möglichkeit zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus eines Pharmakons bietet sich durch die Zugabe von radioaktiven Nährstoffen an. Aus der Veränderung der Einbaurate der Tracer in einzelne Metabolite und Stoffklassen erhält man Hinweise auf gestörte Reaktionen. Auch dieser Methode sind durch die teilweise nur geringfügigen Veränderungen der Incorporation und durch die vielfachen Wechselbeziehungen zwischen den Metaboliten Grenzen gesetzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde über stationäre Metabolitkonzentrationen des Kohlenhydrat-Stoffwechsels und über die Incorporation von C¹⁴-markierter Glucose und Lactat in Stoffwechsel- und Ausscheidungsprodukte der Einfluß des Lindans auf verschiedene Stoffwechselketten in Leber und Muskel der Ratte untersucht. Aus der Bestimmung von Enzymaktivitäten wurden zusätzliche Informationen zur Aufklärung des Lindaneffekts erwartet. Wegen des schnellen Wirkungseintritts von Lindan wurden die meisten Untersuchungen kurzfristig nach der Lindangabe durchgeführt. Da über die Lindanverteilung kurz nach intravenöser Injektion keine vergleichbaren Daten aus der Literatur zur Verfügung standen, wurden zunächst pharmakokinetische Abläufe mit C¹⁴-markiertem Lindan bestimmt, um aus der Organanreicherung mögliche Aufschlüsse über den Wirkungsort zu erfassen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche Ratten (Stamm Sprague-Dawley spf, Gewicht 180 - 200 g) und männliche Mäuse (Stamm NRMI, Gewicht 20 - 30 g), die vom Zentralinstitut für Versuchstierkunde in Hannover bezogen wurden. Gefüttert wurde eine Standarddiät für Ratten und Mäuse der Firma Altromin, Lage/Lippe, Wasser wurde ad libitum gereicht. Im Raum für die Tierhaltung wurde bei gleichbleibender Temperatur ein künstlicher 12-Stundentag aufrechterhalten.

Alle Substanzen, die den Versuchstieren verabreicht werden sollten, wurden in eine Schwanzvene injiziert, da bei dieser Applikationsart die genaue Dosierung des Wirkstoffes und die gleichmäßig schnelle Verteilung im Körper am besten gewährleistet sind.

2.2 Chemikalien und Geräte

2.2.1 Untersuchter Schadstoff

LINDAN, das γ -Isomere von Hexachlorcyclohexan, ist ein hochwirksames Insektizid mit der Summenformel $C_6H_6Cl_6$ und dem Molekulargewicht 291. Seine strukturelle Konfiguration ist in Abbildung 1 dargestellt. Bezogen wurde es von der Firma Merck, Darmstadt.

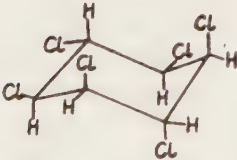


Abb.1: Strukturformel
des Lindans

Wegen seiner geringen Wasserlöslichkeit (10 ppm) mußte es zur Herstellung einer geeigneten In-

jektionslösung in Cremophor EL, einem hochpolymeren, speziellen Lösungsmittel bei 70°C gelöst und anschließend 1 : 4 mit Wasser verdünnt werden.

2.2.2 Radioaktive Substanzen

Alle radioaktiven Substanzen wurden vom Radiochemical Centre, Amersham/Braunschweig geliefert:

U-¹⁴C-Lindan, spezifische Aktivität 46 mCi/mMol, Molekulargewicht 293, Injektionslösung verschnitten mit inaktivem Lindan: 0,5 mg Lindan und 1,25 µCi pro ml Cremophorlösung;

L-¹⁴C-Lactat, spezifische Aktivität 50 mCi/mMol, Molekulargewicht 113,9, Injektionslösung verschnitten mit inaktivem Lactat: 1,86 mg Lactat und 25 µCi pro ml physiologische Kochsalzlösung;

D-U-¹⁴C-Glucose, spezifische Aktivität 316 mCi/mMol, Molekulargewicht 190, Injektionslösung: 250 µCi Glucose pro ml Cremophorlösung (Kontrollversuch), bzw. 250 µCi Glucose und 1,4 mg Lindan (inaktiv) pro ml Cremophorlösung.

2.2.3 Chemikalien und technische Apparate

Zur Messung der radioaktiven Proben wurden folgende Szintillatorflüssigkeiten verwendet:

Monophase, Permafluor V, Insta-Gel und Carbosorb der Firma Packard, Frankfurt und

Unisolve der Firma Zinsser, Frankfurt.

Zur Bestimmung von Glucose, Lactat und Acetylcholinesterase wurde mit kompletten Testansätzen aus der Serie "Biochemica Test Combination" der Firma Boehringer, Mannheim gearbeitet.

Alle benutzten Chemikalien und Biochemikalien waren von höchstmöglicher Reinheit und wurden von den Firmen Merck/Darmstadt, Boehringer/Mannheim und Serva/Heidelberg bezogen.

Die Radioaktivitätsmessungen wurden mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler, Modell SL 30 der Firma Inter-technique GmbH, durchgeführt. Die Quenchkorrektur der gemessenen Proben erfolgte über den externen Standard. Die Proben wurden außerdem um einen entsprechenden Leerwert als "Background" korrigiert.

Zur Aufarbeitung der C14-markierten Organproben wurde ein Probenverbrennungsautomat vom Typ TRI-CARB Sample Oxidizer, Modell 306 der Firma Packard Instruments benutzt.

Die proteingebundenen Aminosäuren einzelner Organe wurden nach saurer Hydrolyse in einem Aminosäure-Analysator aufgetrennt und anhand der Ninhydrinreaktion quantitativ bestimmt. Der verwendete Analysator war ein Flüssigkeits-Säulenchromatograph, Modell 4255 Multichrom der Firma Beckman Instruments, München.

2.3 Bestimmung der Blutspiegelkurve

Die Veränderung der Lindankonzentration im Blut wurde anhand der Radioaktivitätsänderung nach intravenöser Injektion von C14-Lindan nachgewiesen. Der Versuch wurde mit männlichen Ratten durchgeführt.

Den Tieren wurde ungefähr 0,5 μCi Lindan, vermischt mit inaktivem Lindan zu einer Dosis von 200 μg , intravenös injiziert. Unmittelbar nach der Injektion wurde die Schwanzspitze kupiert, um daraus durch Ausstreichen der Venen Blut zu gewinnen. Die Blutproben wurden in bestimmten Abständen bis 60 Minuten p.a. entnommen.

Bei jeder Blutentnahme wurden 3-4 Tropfen Blut auf eine vorgewogenen Zellstoffpille abgestreift und das Gewicht der Blutprobe durch Rückwägung festgestellt. Die mit Blut getränkten Pillen wurden im Probenverbrennungsautomat verbrannt und die C14-Aktivität der Blutprobe gemessen.

Aus dem Gewicht und der Radioaktivität der einzelnen Blutproben konnte die spezifische Aktivität, und damit der Lindangehalt des Blutes zu den untersuchten Zeitpunkten bestimmt und der Verlauf der Konzentrationsänderung dargestellt werden.

2.4 Versuchsablauf zum Nachweis der Organverteilung

Die Organverteilung nach intravenöser Injektion wurde ebenfalls mit C14-markiertem Lindan bestimmt. Als Versuchstiere dienten männliche Ratten mit einem Gewicht zwischen 180 und 220 Gramm, denen 12 Stunden vor Versuchsbeginn das Futter entzogen wurde.

Den Ratten wurde 2 ml/kg Körpergewicht der Injektionslösung i.v. injiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten p.a. wurden die Tiere mit Äther betäubt und durch Öffnen der Halsschlagadern getötet. Das Blut wurde aufgefangen und nach Gerinnung zum Abtrennen des Serums zentrifugiert.

Die Radioaktivität und damit die Lindankonzentration folgender Organe und Gewebeproben wurde bestimmt: Leber, Nieren, Milz, Nebennieren, Pankreas, Lunge, Herz, Zwerchfell, Ösophagus, Hoden, Nebenhoden, Anhangdrüsen des Genitalsystems, epididymales, peritoneales und subcutanes Fettgewebe, Oberschenkelmuskulatur, Gehirn, Rückenmark, Magen, Dünndarm, Blinddarm und Dickdarm. Die Organe wurden von anhängendem Fett, Gewebeteilen und Blut befreit und Aliquots von 500 bis 1000 mg zur Aktivitätsmessung aufgearbeitet.

Der ausgeschnittene Kadaver, bestehend aus Muskulatur, Fell, Haut, Knochen, Bindegewebe, Fett und Blut, wurde mit einem elektrischen Fleischwolf zu einer einzigen homogenen Probe zerkleinert, die als "Resttier" bezeichnet wurde. Magen- und Darminhalt wurden ausgespült und gesondert weiterbehandelt.

Serum und Überstand des Magen-Darm-Inhaltes wurden direkt zur Messung der Radioaktivität eingesetzt. Die Organproben wurden über Phosphorpentoxid getrocknet, mit Filterpapier zu Pillen gepreßt und im Sample Oxidizer verbrannt. Die C14-Aktivität der einzelnen Proben konnte im Szintillationszähler bestimmt werden. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt, beim Resttier Mehrfachbestimmungen.

2.5 Messung von stationären Metabolitkonzentrationen

2.5.1 Probenaufbereitung

Den nüchternen Versuchstieren (Ratten ♂♂, 180-200 g) wurde 1 mg unmarkiertes Lindan pro kg Körpergewicht intravenös injiziert, eine Gruppe von Versuchstieren erhielt das reine Lösungsmittel. 30, 60 und 180 Minuten p.a. wurden die Tiere durch Öffnen der Halsschlagadern getötet.

Unmittelbar nach dem Tod wurde die Leber und ein Teil der Oberschenkelmuskulatur entnommen und in vorgekühltem Hexan (-40°C) schockgefroren. Muskel- und Leberproben wurden mit 5 Volumenteilen eiskaltem Methanol im Ultraturrax unter Kühlung homogenisiert und anschließend 15 Minuten bei 5000 bis 6000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal in einem Folch-Sperry-Gemisch extrahiert und zentrifugiert.

Sämtliche Überstände wurden vereinigt, mit Aqua dest. versetzt und zur Phasentrennung zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde im Trockenschrank bei 50 bis 60 Grad eingedampft, der Rückstand in Wasser gelöst und zur Bestimmung eingesetzt.

2.5.2 Nachweismethoden

Die Malatkonzentration wurde nach der Methode von GUTMAN und WAHLEFELD (1970) mit Malatdehydrogenase und NAD^+ ermittelt.

Die Citratbestimmung erfolgte mit Citratlyase nach der Methode von MÖLLERING und GRUBER (1970). Gleichzeitig mit der Citratbestimmung wurde der Gesamtgehalt von Pyruvat und Oxalacetat ermittelt.

Der Glucosegehalt wurde mit der Hexokinase-Methode nach Arbeitsvorschrift einer Testkombination von Boehringer bestimmt.

Die Lactatkonzentration wurde nach der Methode von HOHORST (1970) ebenfalls mit einem Testsatz von Boehringer ermittelt.

Die freien Aminosäuren wurden über die Ninhydrinreaktion nach der Vorschrift von DÉVÉNYI u. GERGELY (1968) erfaßt.

2.6 Bestimmung des oxidativen Lactatabbaus

Nach Applikation von C^{14} -markiertem Lactat läßt sich der Anteil des oxidativ abgebauten Lactats über die Radioaktivität des ausgeatmeten Kohlendioxids bestimmen.

Zu Versuchsbeginn wurde pro Ratte 1 mg Lindan/kg intravenös injiziert, die Kontrolltiere erhielten das reine Lösungsmittel. Nach 30 bzw. 120 Minuten bekam dasselbe Tier

0,12 ml der C¹⁴-markierten Lactatlösung ($\hat{=}$ 3 μ Ci) ebenfalls i.v. appliziert und wurde in eine Versuchsaapparatur eingesetzt, die es ermöglichte, die gesamte ausgeatmete Luft durch zehnprozentige Kaliumlauge zu leiten. Das Kohlendioxid wird in der Kaliumlauge quantitativ gebunden und geht als Kaliumcarbonat in Lösung.

Während einer Versuchsdauer von 3 Stunden wurden zu festgesetzten Zeitpunkten Doppelproben aus der KOH-Waschflasche entnommen, mit Wasser 1:3 verdünnt und in einem Zählgefäß mit Unisolve vermischt.

Nach Abklingen der Chemolumineszenz wurde die C¹⁴-Aktivität der Proben im Counter gemessen. Die natürliche K⁴⁰-Aktivität der gemessenen Proben wurde mit einer entsprechend verdünnten KOH-Probe bestimmt und als Background eingesetzt.

2.7 Versuchstechnik zur Bestimmung des Glucosestoffwechsels unter Lindanbelastung

Der Versuch wurde an männlichen Mäusen mit einem Gewicht von 25 g durchgeführt. Je Versuchstier wurde 25 μ Ci C¹⁴-Glucose vermischt mit 140 μ g inaktivem Lindan i.v.injiziert. Nach der Injektion wurden die Tiere in Zweiergruppen in Stoffwechselkäfige eingesetzt, um Kot, Harn und CO₂ während der Versuchsdauer aufzufangen.

Nach 5 Stunden wurden die Mäuse unter Äthernarkose durch Öffnen der Halsschlagadern getötet. Das Blut wurde aufgefangen und Leber, Nieren, Herz, Milz, Pankreas, Gehirn und eine Muskelprobe herauspräpariert.

Die C¹⁴-Aktivität von Harn, Serum und Kohlendioxid (gelöst in KOH) wurde direkt in Monophase gemessen, die Radioaktivität von Kot- und Blutproben wurde nach Verbrennung im Sample Oxidizer bestimmt.

Die Organe wurden nach folgendem Schema aufgearbeitet, um die einzelnen Stoffklassen in Lösung zu bringen und die Messung ihrer Radioaktivität zu ermöglichen:

Behandlung des Sediments S	zentri- fugier.	Bestimmung im Über- stand U
Organprobe in Methanol homogenisieren	+	U ₁ }
S ₁ + Chloroform-Methanol	+	U ₂ } C14-Aktivität
S ₂ + Chloroform-Methanol	+	U ₃ } von U ₁ - U ₄
S ₃ + Methanol 80 %	+	U ₄ }
S ₄ + 0,5 n HClO ₄ , 20' 70°	+	U ₅ }
S ₅ + 0,5 n HClO ₄ , 20' 70°	+	U ₆ } C14-Aktivität
S ₆ lösen in 6,66 n HCl		U ₇ Proteinbestim.
↓		C14-Aktivität
36 Std Hydrolyse bei 105°C, HCl abdampfen, in H ₂ O lösen		Hydrolysat: C14-Ak- tivität, Ninhydrin- Reaktion

Trenngang nach SPECK und URICH (1969)

Proteinbestimmung nach LOWRY et al. (1951)

Das wäßrige Aminosäuregemisch wurde mit Natriumcitratpuffer (pH 2,2) angesäuert und über den Aminosäure-Analysator aufgetrennt. Die Zuordnung der aufgetrennten Fraktionen zu den einzelnen Aminosäuren und die Bestimmung des Aminosäuregehalts erfolgte anhand eines Eichstandards.

Nach der Analyse wurden die Aminosäurefraktionen getrennt

aufgefangen und ihr Volumen bestimmt. Zur Bestimmung der C14-Aktivität wurden Aliquots mit Perhydrol (30%) entfärbt und in Insta-Gel im Counter gemessen.

2.8 Messung von Enzymaktivitäten in Organproben

2.8.1 Cytochromoxidase und Succinatdehydrogenase in Leber und Muskel der Ratte

Als Versuchstiere dienten nüchterne Ratten von 180 bis 200 g Körpergewicht. Die Tiere erhielten 1 mg Lindan/kg i.v. injiziert, die Kontrolltiere das reine Lösungsmittel. Nach 30 bzw. 120 Minuten wurde jeweils eine Dreiergruppe aufgearbeitet: zwei lindanbelastete Tiere und ein Kontrolltier.

Die Tiere wurden durch Genickschlag getötet. Sofort nach dem Ausbluten wurde eine Leber- und eine Muskelprobe entnommen, gewogen, mit kaltem Phosphatpuffer nach Sørensen (20 mM, pH 7,3) versetzt und mit dem Ultraturrax unter Kühlung homogenisiert. Das Homogenat wurde 15 Minuten mit $20\,000 \times g$ bei 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde erneut in Phosphatpuffer suspendiert und dreimal 10 Sekunden mit Ultraschall*) desintegriert. Die Sedimentsuspension wurde zur Aktivitätsbestimmung der respiratorischen Enzyme eingesetzt.

Die Aktivität der Cytochromoxidase (EC.1.9.3.1) wurde mit der Methode nach ALBAUM et al. (1946) ermittelt.

Konzentrationen im Testansatz: Phosphatpuffer 100 mM pH-Wert 7,4; Cytochrom c (reduziert) 0,08 %;

Testvolumen $V = 250\ \mu\text{l}$; Probevolumen $v = 10\ \mu\text{l}$; Extinktionskoeffizient $\epsilon = 12\ \text{cm}^2/\mu\text{Mol}$ bei 546 nm.

Die Reaktionsgeschwindigkeit der Succinatdehydrogenase (EC.1.3.99.1) wurde nach der Vorschrift von MASSEY (1959) bestimmt.

*) Sonifier B 12, Branson Sonic Power Company

Konzentrationen im Testansatz bei einem Testvolumen von 250 μ l: Phosphatpuffer 100 mM, pH 7,4; KCN 10 mM; FMS 0,1 mM; Cytochrom c 0,1 %; Natriumsuccinat 20 mM; $v = 10 \mu$ l; $\epsilon_{546 \text{ nm}} = 12 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$.

Die Enzymaktivitäten werden in Unit pro g Frischgewicht angegeben (= U/g FG), wobei ein Unit einem Substratumsatz von einem Mikromol pro Minute entspricht.

2.8.2 Acetylcholinesterase im Gehirnhomogenat von Mäusen

Mäuse mit einem Gewicht von 20 - 30 g wurden 30 Sekunden nach einer i.v. Injektion (Lindan oder Tremphor) durch Bruch der Halswirbelsäule getötet und entblutet. Das Gehirn wurde sofort entnommen, in Puffer gewaschen und im Minipotter in NaHCO_3 (0,25 mM) homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 5000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und der Überstand zur Bestimmung eingesetzt.

Die Aktivität der Acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7) wurde nach der Methode von ELLMAN et al. (1961) mit der Testkombination "Cholinesterase" der Firma Boehringer ermittelt. Testbedingungen: Testvolumen 1,6 ml; $\epsilon = 13,200 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$ bei $\lambda_{\text{g}} 405 \text{ nm}$.

Endkonzentrationen im Test: Phosphatpuffer 40,56 mM, pH-Wert 7,2; 5,5-Dithiobisnitrobenzoesäure 0,25 mM; Acetylthiocholin 5 mM.

Zur Untersuchung der Enzymkinetik wurde der Substratumsatz in Abhängigkeit von der Substratkonzentration nach Lindanzugabe in vitro getestet.

Variable Substratkonzentrationen im Test von 0,005 mM bis 5 mM; Lindankonzentrationen im Test: $L_1 = 7,6 \cdot 10^{-2} \text{ mM}$, $L_2 = 15,2 \cdot 10^{-2} \text{ mM}$, $L_3 = 22,8 \cdot 10^{-2} \text{ mM}$.

2.9 Mathematische Methoden zur Statistik und Kinetik

Die Berechnung des Mittelwertes $\bar{x}$ und der Standardabweichung s erfolgte nach den Formeln

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad \pm s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \left[\sum (x_i^2) - \frac{1}{n} (\sum x_i)^2 \right]}$$

wobei x_i die gemessenen Einzelwerte und n die Anzahl dieser Werte waren.

Extrem vom Mittelwert abweichende Werte wurden mit dem Ausreißertest nach NALIMOV (1972) überprüft und bei einer Wahrscheinlichkeit von $P \geq 99\%$ eliminiert.

$$r^* = \frac{|x^* - \bar{x}|}{s} \cdot \sqrt{\frac{n}{n-1}} \quad \begin{array}{l} r^* = \text{Prüfgröße (Tabelle!)} \\ x^* = \text{ausreißerverdächtiger Wert} \end{array}$$

Der Einfluß des Lindans auf den oxidativen Lactatabbau und auf die Aktivität von Cytochromoxidase, Succinatdehydrogenase und Acetylcholinesterase wurde mit dem t -Test nach STUDENT (aus SACHS, 1974) abgesichert. Die statistische Kenngröße Tau wurde entsprechend der nachfolgenden Formel berechnet und die statistische Sicherheit P (%) anhand der zugehörigen Tabellen ermittelt. Die Signifikanzgrenze wurde für $P = 99\%$ festgelegt.

$$t = \left| \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_d} \right| \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}} \quad s_d = \sqrt{\frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Der Lindaneeffekt auf die Metabolitkonzentrationen wurde mit dem verteilungsunabhängigen Zweistichprobentest von WILCOXON, MANN und WHITNEY (aus SACHS, 1974) überprüft.

Die Einzelwerte von zwei zu vergleichenden Meßreihen werden in aufsteigender gemeinsamer Rangfolge geordnet und durchgehend nummeriert. Die gesuchte Prüfgröße U ist zu berechnen aus den beiden Summen der Rangzahlen und der jeweiligen Anzahl der Einzelergebnisse aus den zu vergleichenden Versuchsreihen. Die kritischen Werte für U, die bei den vorhandenen Freiheitsgraden eine vorgegebene statistische Sicherheit gewährleisten, sind aus dazugehörigen Tabellen zu ersehen.

Die mathematische Lösung der kinetischen Probleme erfolgte nach den Methoden von DOST (1968).

Formel zur Blutspiegelkurve im Zweikompartimentmodell:

$$Y(t) = C_1 e^{-\gamma_1 t} + C_2 e^{-\gamma_2 t}$$

Ausscheidungsfunktion für Lactat über CO_2 :

$$f(t) = a \cdot e^{-k_{21} t}$$

a = Anfangskonzentration (= 100 % der injizierten Radioaktivität)

C_1/C_2 = fiktive Anfangskonzentrationen im Zweikompartimentmodell, $C_1 + C_2 = a$

$\gamma_1/\gamma_2/k_{21}$ = Geschwindigkeitskonstanten

3. ERGEBNISSE

3.1 Kinetik des Lindans im Blut der Ratte

Die Erstellung einer Blutspiegelkurve erschien aus mehreren Gründen angebracht: zum einen, um die Abnahme der Lindankonzentration im Blut zu erfassen, zum anderen, um Aufschluß über die Verteilungsräume des Lindans zu erhalten. Zudem erleichtert die Kenntnis des Blutspiegels die Wahl des frühest geeigneten Zeitpunkts für die Bestimmung der Organverteilung.

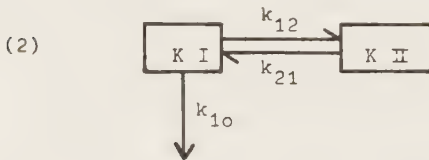
Mit Hilfe von pharmakokinetischen Modellen ist es möglich, den Konzentrationsverlauf des Lindans im Blut mathematisch zu beschreiben (DOST, 1968). Da sich der Verteilungsraum des Lindans im Organismus nicht nur auf das Blut beschränkt (DAVIDOW & FRAWLEY, 1951), muß die Abnahme der Lindankonzentration im Blut wie bei einem Zwei- oder Mehrkompartimentsystem verlaufen, die bei n Kompartimenten folgendermaßen definiert ist (DOST, 1968):

$$(1) \quad Y(t) = C_1 e^{-\gamma_1 t} + C_2 e^{-\gamma_2 t} + \dots + C_n e^{-\gamma_n t}$$

Theoretisch können alle Parameter dieser Funktion bei halblogarithmischer Auftragung graphisch durch die Aufspaltung der zusammengesetzten Exponentialfunktion in einzelne Geraden mit den Steigungen $\gamma_1 \dots \gamma_n$ und den Ordinatenschnittpunkten $\ln C_1 \dots \ln C_n$ bestimmt werden. In der Praxis können nur die Glieder als Gerade abgeschält werden, deren Exponentialkoeffizienten sich mindestens um den Faktor 2,5 unterscheiden (SCHINDEWOLF, 1959).

Zur Berechnung der Blutspiegelkurve wurde angenommen, daß das in den Organismus gebrachte Lindan zwei Vertei-

lungsräume erfüllt: das Blut als Eingangskompartiment K I und den extravasalen Raum als zweites Kompartiment K II. Die Verbindung zwischen den beiden Kompartimenten sei durch die Geschwindigkeitskonstanten k_{12} und k_{21} gegeben, die den Lindanaustausch bestimmen. Außerdem sei vorgegeben, daß das Lindan oder seine Metabolite nur über das erste Kompartiment aus dem System entlassen werden kann. Die bestimmende Konstante sei k_{10} .



Unter diesen Voraussetzungen ergeben sich für die Parameter der Exponentialgleichung (1) und die Geschwindigkeitskonstanten des Zweikompartimentmodells (2) folgende Beziehungen (DOST, 1968; SAUNDERS & NATUNEN, 1972):

$$(3) \quad \gamma_1 + \gamma_2 = k_{12} + k_{21} + k_{10}$$

$$(4) \quad \gamma_1 \cdot \gamma_2 = k_{21} \cdot k_{10}$$

$$(5) \quad k_{21} = \frac{C_1 \cdot \gamma_2 + C_2 \cdot \gamma_1}{C_1 + C_2}$$

Abbildung 2 zeigt die Blutspiegelkurve einer 434 g schweren Ratte, der 226 µg Lindan mit 0,57 µCi intravenös injiziert wurden. Die Werte sind als prozentualer Anteil der injizierten C14-Aktivität im Gesamtblut zur Zeit t dargestellt. Das Blutvolumen wurde aus dem Standardwert von 47 ml Blut pro kg Körpergewicht (BIEWALD & BILLMEIER, 1978) mit 20,4 ml bestimmt. Die C14-Aktivität im Blut wurde über einen Zeitraum von 60 Minuten gemessen.

Da das Insektizid nur langsam injiziert werden konnte, ist die maximale Lindankonzentration zum Zeitpunkt $t = 0$ schon erreicht. Die Aktivität im Blut nimmt innerhalb der ersten 4 Minuten um 95 Prozent ab und verringert sich bis zum Versuchsende langsam auf 1,5 Prozent der injizierten Dosis.

Trägt man den natürlichen Logarithmus der prozentualen C14-Aktivität im Blut $\ln Y$ gegen die Zeit auf (Abb.3), so kann man die beiden Regressionsgeraden y_1 und y_2 bestimmen. Die Ordinatenschnittpunkte $\ln C_1$ und $\ln C_2$ sowie die Steigungen γ_1 und γ_2 können graphisch ermittelt oder nach einem Gleichungssystem berechnet werden, das die optimale Gerade über einer Anzahl von Wertepaaren angibt (DOST, 1968):

$$\gamma = \frac{\sum_{i=1}^n t_i \ln y_i - \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n t_i \sum_{i=1}^n \ln y_i}{\sum_{i=1}^n t_i^2 - \frac{1}{n} \left(\sum_{i=1}^n t_i \right)^2} \quad \ln C = \frac{\sum_{i=1}^n \ln y_i}{n} - \gamma t_i$$

Die Regressionsgerade y_1 , die die langsame zweite Phase der Konzentrationsabnahme beschreibt, verläuft nach der Gleichung

$$y_1(t) = -0,0099 t + 1,1211$$

Die zweite Regressionsgerade y_2 , die aus dem raschen Konzentrationsabfall in der Anfangsphase resultiert, verläuft durch die Wertepaare $t_i / \ln (Y(t) - C_1 e^{-\gamma_1 t})_i$. Mathematisch ist sie definiert durch die Gleichung

$$y_2(t) = -0,8982 t + 4,5886$$

Durch Delogarithmieren der Ordinatenabschnitte erhält man die fiktiven Anfangskonzentrationen der zusammengesetzten Exponentialfunktion (1). Die Blutspiegelkurve des Lindans

kann für die erste Stunde nach intravenöser Injektion durch die Funktion

$$Y(t) = 3,1 e^{-0,01 \cdot t} + 98,3 e^{-0,9 \cdot t}$$

beschrieben werden mit den Parametern

$$C_1 = 3,1 \% \text{ der injizierten Dosis} \hat{=} 0,34 \mu\text{g/ml},$$

$$C_2 = 98,3 \% \text{ der injizierten Dosis} \hat{=} 10,9 \mu\text{g/ml},$$

$$\gamma_1 = 0,01 \text{ min}^{-1} \quad \text{und} \quad \gamma_2 = 0,9 \text{ min}^{-1}.$$

Die Auflösung der Gleichungen (3), (4) und (5) ergibt für die Geschwindigkeitskonstanten des Zweikompartmentensystems

$$k_{12} = 0,630 \text{ min}^{-1}$$

$$k_{21} = 0,037 \text{ min}^{-1}$$

$$k_{10} = 0,242 \text{ min}^{-1}$$

Um die als Grundlage der Berechnungen aufgestellte Hypothese eines Zweikompartmentmodells zu untermauern, wurden die Werte der Blutspiegelkurve nach der Methode von SAUNDERS und NATUNEN (1972) überprüft. Sie fordern für ein Zweikompartmentensystem, daß $(V_4 - V_3)$ dividiert durch V_3 größer oder gleich 0,1 sei. Dabei entspricht V_4 dem numerischen Wert des Ordinatenschnittpunktes einer Regressionsgerade über alle Wertepaare und V_3 der fiktiven Anfangskonzentration der langsameren Konzentrationsabnahme in der zweiten Phase.

Die Regressionsgerade über alle Wertepaare berechnet sich nach Gleichung (6) und (7) mit

$$y(t) = -0,034 t + 2,0421 \quad V_4 = 7,71$$

V_3 ist laut Definition gleichzusetzen mit $C_1 = 3,1$. Somit ergibt sich für

$$\frac{V_4 - V_3}{V_3} = \frac{7,71 - 3,1}{3,1} = 1,51 > 0,1$$

Das Vorliegen eines Zweikompartmentmodells wird damit bestätigt.

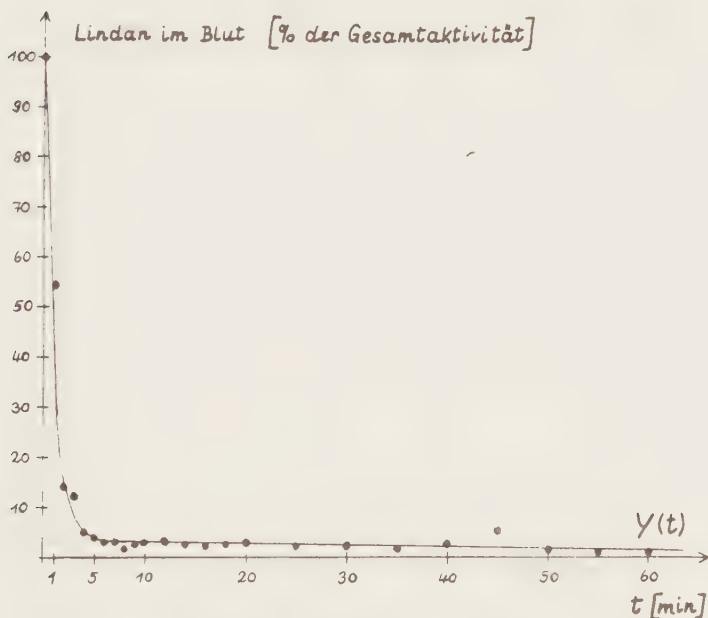


Abb: 2. Blutspiegelverlauf des Lindans $Y(t)$ bei der Ratte nach intravenöser Injektion von C^{14} -markiertem Lindan (0,52 mg mit $1,3 \mu\text{Ci/kg}$)

- theoretischer Kurvenverlauf
 • experimentell ermittelte Werte

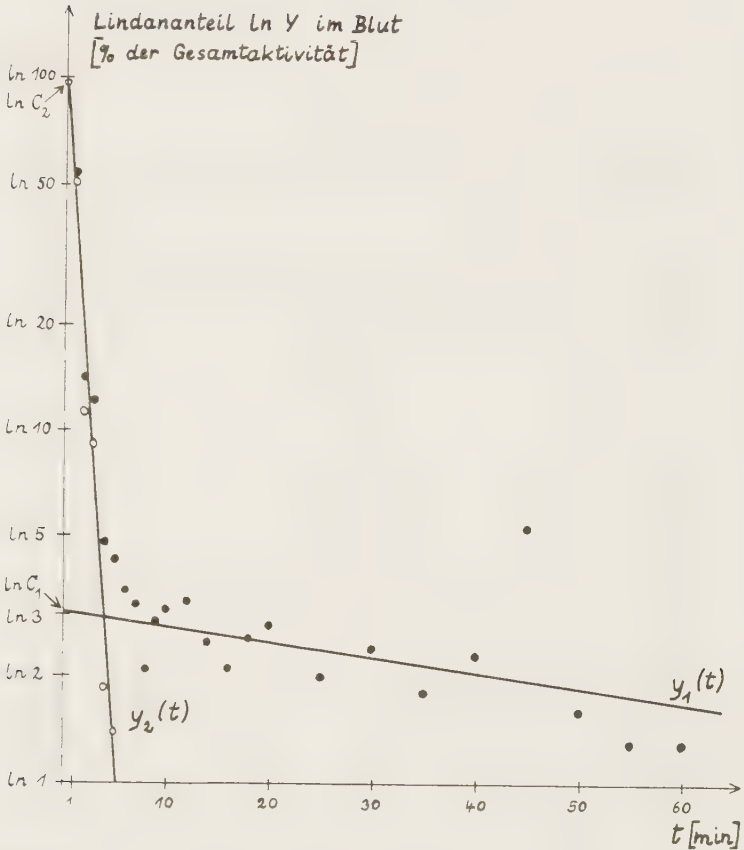


Abb. 3: Halblogarithmische Auftragung der Blutspiegelkurve des Lindans nach Injektion von C^{14} -Lindan ($1,3 \mu\text{Ci/kg}$)

Regressionsgerade $y_1(t) = -0,01 t + 1,1211$

Regressionsgerade $y_2(t) = -0,9 t + 4,5886$

• $\ln$ Meßpunkte, $\circ \ln (\text{Meßpunkte} - C_1 e^{-\lambda_1 t})$

3.2 Lindanverteilung nach intravenöser Injektion von C14-Lindan auf die Organe der Ratte

Der früheste Zeitpunkt für die Bestimmung der Lindanverteilung wurde aufgrund der Blutspiegelkurve 10 Minuten nach der Injektion des C14-markierten Wirkstoffes festgesetzt, weitere Untersuchungen folgten 30, 60, 120 Minuten und 24 Stunden p.a.

Neben der prozentualen Verteilung wurde ein sogenannter Anreicherungsfaktor ARF (SPECK & URICH, 1970) berechnet, der, unabhängig von Körpergewicht und applizierter Dosis, einen direkten Vergleich der Lindananreicherung in den einzelnen Organen erlaubt. Der ARF ist definiert als Quotient aus der spezifischen C14-Aktivität im Organ durch die mittlere spezifische C14-Aktivität im Gesamttier. Ist der Anreicherungsfaktor gleich eins, so entspricht die Lindankonzentration im untersuchten Organ dem Wert, der sich bei Gleichverteilung des im Körper vorhandenen Lindans einstellen würde.

Alle Werte über die Lindanverteilung in Prozent der injizierten Aktivität (Tab. 2) und über die Lindananreicherung (Tab. 1) sind Mittelwerte, die aus zwei Tieren pro Zeitpunkt gewonnen wurden. Die Werte der Lindananreicherung wurden um den Blutanteil der betreffenden Organe (BIEWALD & BILLMEIER, 1978) korrigiert, während die im Blutanteil vorhandene Lindanmenge bei der Berechnung der prozentualen Organverteilung wegen ihres geringen Prozentsatzes vernachlässigt werden konnte.

Vergleicht man die Anreicherungsfaktoren der einzelnen Organe über den Zeitraum von 24 Stunden, so findet man eine erhebliche Lindananreicherung in den Nieren, in den Nebennieren und im Fett. In der Leber pendelt sich der

Anreicherungsfaktor nach anfänglich erhöhtem Wert schon nach 60 Minuten auf ungefähr 1,0 ein, so daß man nicht mehr von einer Anreicherung sprechen kann. Konstant erhöht ist die Lindananreicherung dagegen im Herzen¹ (ARF 1,3 - 1,6). Im Gehirn steigt der Anreicherungsfaktor nur zögernd auf 1,1 an, während die Werte im Rückenmark von 10 bis 120 Minuten p.a. einer fiktiven Gleichverteilung entsprechen. Im Pankreas unterliegt die Lindananreicherung größeren Schwankungen (ARF zwischen 0,7 und 2,5), was aber wahrscheinlich auf Präparierfehler zurückzuführen sein dürfte. In allen anderen Organen und Geweben reichert sich Lindan nicht an (ARF unter 1).

Zwischen 2 und 24 Stunden p.a. beginnt die Ausscheidung der injizierten C14-Aktivität, die nach einem Tag rund 20 Prozent erreicht (Tab. 2). Vergleicht man die Anreicherungs-faktoren für diese beiden Zeitpunkte (Tab. 1), so kann man aus ihrer Veränderung Rückschlüsse auf das Speichervermögen der einzelnen Organe gegenüber Lindan bzw. seinen Abbauprodukten ziehen. Entspricht nämlich die Lindanabgabe aus dem Organ (in Prozent der im Organ gespeicherten Lindanmenge) dem Prozentsatz der Gesamtausscheidung, so bleibt der ARF gleich. Sinkt der ARF ab, so gibt das betreffende Organ Lindan in stärkerem Maße ab. Ist dagegen ein Anstieg des ARF zu verzeichnen, so wird entweder weniger oder gar kein Lindan abgegeben, oder der Prozeß der Lindanspeicherung läuft weiter. Der kritische Wert des ARF, bei dem der Lindangehalt des Organs unverändert bleibt, berechnet sich nach:

$$ARF_x = \frac{ARF_{\text{vor der Elimination}} \times \text{injizierte Aktivität}}{\text{injizierte - ausgeschiedene Aktivität}}$$

Bezieht man den kritischen Wert ARF_x in die Analyse der Lindananreicherung mit ein, so wird deutlich, daß das

Lindan 24 Stunden p.a. bevorzugt aus dem Blut und aus dem Resttier zur Ausscheidung gelangt. In der gleichen Größenordnung wie die Gesamtelimination verläuft der Ausscheidungsprozeß aus Leber und Gehirn.

Obwohl die Lindananreicherung in Niere, Nebenniere, Fett, Rückenmark, Muskel und Herz zwischen 2 und 24 Stunden p.a. zunimmt (Tab. 1 und Abb. 4), kann man unter diesem Aspekt drei Organgruppen unterscheiden. Im Fett wird trotz der 20-prozentigen Ausscheidung aus dem Gesamttier weiterhin kontinuierlich, wenn auch langsamer als zwischen 1 und 2 Stunden p.a., Lindan gespeichert. In Muskel und Rückenmark reichert sich die C14-Aktivität mit beginnender Ausscheidung plötzlich wieder aktiv an.

Die spezifische Aktivität des Herzens bleibt konstant, das bedeutet, daß die Invasions- und Eliminationsvorgänge von Lindan mit der gleichen Geschwindigkeit verlaufen müssen. Aus Nebenniere und Niere wird zwar effektiv Lindan abgegeben, aber die Abgaberate ist nur um den Faktor 1,1 höher als die Aufnahmerate, so daß ebenso wie im Herz für Niere und Nebenniere ein Sättigungswert zu vermuten ist. Wie Abbildung 4 zeigt, sind die Nieren das mit Abstand am stärksten Lindan oder seinen Folgeprodukten belastete Organ. Sie weisen 2 Stunden nach Injektion die höchste spezifische Aktivität auf, was wahrscheinlich mit ihrer Funktion als Ausscheidungsorgan zusammenhängt.

Betrachtet man dagegen die prozentuale Verteilung der C14-Aktivität (Tab. 2), so ist der Hauptanteil der C14-Aktivität im Resttier zu finden, zum einen wegen seines hohen Gewichtanteils ($3/4$ des Gesamtgewichts), zum anderen wegen des lindanreichen Fettgewebes, das zum Resttier zählt. An nächster Stelle folgen Nieren und Leber.

Auffällig ist der 60-Minuten-Wert, der in den meisten Or-

ganen zu niedrig liegt, im Resttier jedoch ziemlich hoch erscheint. Auch der Anreicherungsfaktor für das Resttier zeigt zu diesem Zeitpunkt einen ungewöhnlichen Anstieg. Da diese allgemeine Abweichung von der Norm auf den extrem unterschiedlichen Werten von nur einem Versuchstier beruht, liegt die Ursache möglicherweise in einer mißglückten intravenösen Injektion, bei der ein Teil der C14-Aktivität subcutan verabreicht wurde.

Neben der prozentualen Verteilung der Aktivität auf Organe und Resttier ist in Tabelle 2 der C14-Anteil in den Ausscheidungsprodukten angegeben, die sich aus Magen- und Darminhalt, Harn und Kot zusammensetzen. Erst nach 24 Stunden Standzeit konnte in Kot und Harn C14-Aktivität nachgewiesen werden, so daß bei den Gruppen bis zu 2 Stunden p.a. lediglich die Radioaktivität von Magen- und Darminhalt angegeben wurde. 64 Prozent der nach einem Tag ausgeschiedenen Aktivität waren im Harn enthalten, 33 Prozent im Kot und 2 Prozent befanden sich noch in Magen und Darm.

Der Wiederfund der injizierten C14-Aktivität lag bei allen Versuchen zwischen 88 und 95 Prozent. Der Aktivitätsverlust setzt sich zusammen aus Meßfehlern beim Aufziehen der Injektionsspritze, aus Substanzverlusten beim Präparieren, aus Wägefehlern bei der Probenaufbereitung, aus Zählfehlern beim Messen der Radioaktivität und aus anderen experimentell bedingten Fehlern.

Tabelle 1: Lindananreicherung in verschiedenen Organen und Geweben der Ratte nach intravenöser Injektion von C¹⁴-Lindan (2,5 µCi/kg)
Angaben in Anreicherungsfaktoren ARF*

Zeit p. a. Organ	10 min	30 min	1 Std	2 Std	24 Std
Leber	2,22	1,32	1,15	1,07	1,05
Niere	8,95	10,49	7,95	21,13	25,15
Nebenniere	4,18	2,31	2,39	5,64	6,15
Herz	1,29	1,51	1,03	1,33	1,64
Pankreas	2,11	0,74	0,82	2,44	1,50
Gehirn	0,75	0,65	0,73	1,14	1,13
Rückenmark	0,97	0,83	1,00	1,01	1,58
Muskel	0,60	0,37	0,21	0,23	0,49
Blut	0,40	0,34	0,20	0,29	0,11
Fett**	2,16	2,07	2,30	4,71	9,47
Resttier	0,91	0,31	1,00	0,76	0,52

spez. Aktivität im Organ
*: ARF = $\frac{\text{spez. Aktivität im Organ}}{\text{mittlere spez. Aktivität im Tier}}$

**: Mittelwert aus peritonealem, subcutanem und epididymalem Fettgewebe

Tabelle 2: Lindanverteilung auf die Organe der Ratte
nach i.v. Injektion von C14-markiertem
Lindan (2,5 μ Ci/kg)
Angaben in Prozent der injizierten C14-Akti-
vität

Zeit p. a. Organ	10 min	30 min	1 Std	2 Std	24 Std
Leber	7,21	5,72	4,13	3,56	3,82
Nieren	6,90	8,75	6,30	14,19	13,26
Nebennieren	0,09	0,05	0,04	0,10	0,08
Milz	0,17	0,10	0,12	0,12	0,16
Pankreas	0,78	0,34	0,46	0,84	0,61
Lunge	0,55	0,69	0,45	0,42	0,53
Herz	0,55	0,59	0,36	0,48	0,47
Zwerchfell	0,33	0,25	0,19	0,19	0,35
Gehirn	0,66	0,54	0,58	0,84	0,63
Rückenmark	0,14	0,12	0,12	0,13	0,18
Hoden	0,60	0,42	0,27	0,22	0,50
Nebenhoden	0,17	0,15	0,08	0,12	0,17
♂ Drüsen	0,19	0,13	0,09	0,26	0,40
Ösophagus	0,05	0,03	0,04	0,03	0,04
Magen	0,39	0,32	0,38	0,33	0,35
Dünndarm	1,12	0,66	0,72	1,10	0,98
Dickdarm	0,21	0,13	0,11	0,27	0,37
Blinddarm	0,08	0,06	0,04	0,06	0,28
Resttier	68,96	67,70	79,82	64,11	49,18
Ausscheidungs- produkte	0,78	0,98	0,74	1,07	20,42

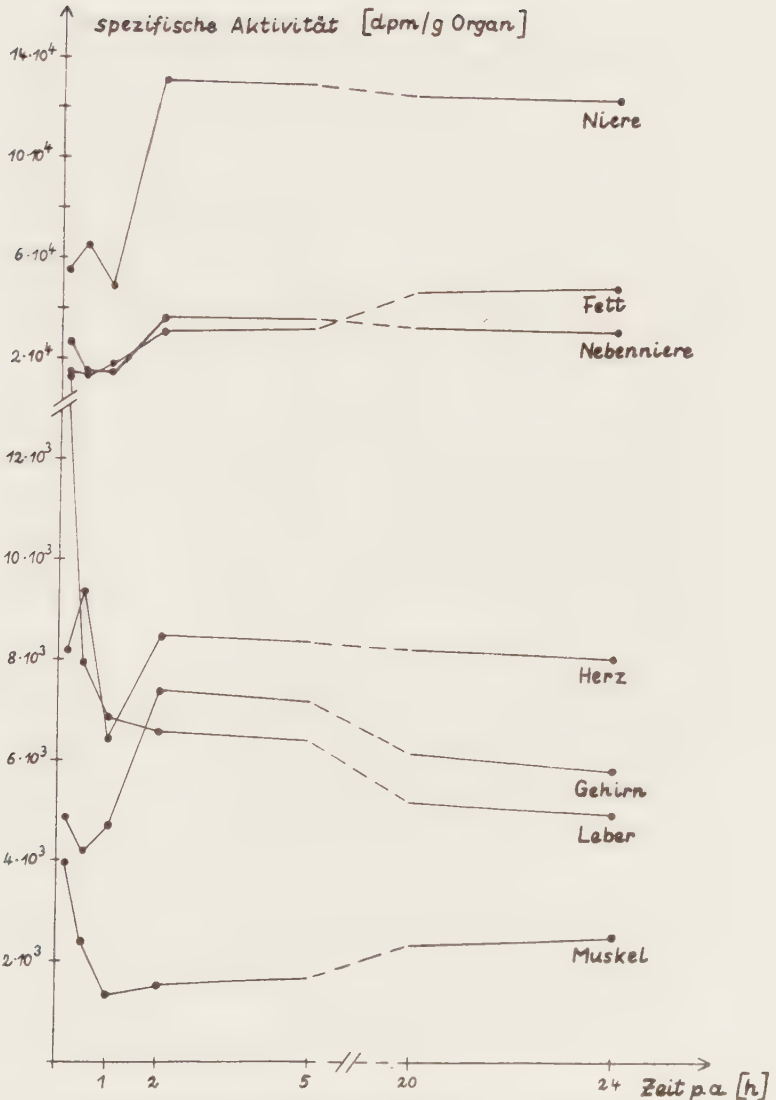


Abb. 4: Verlauf der Lindankonzentration in den Organen der Ratte nach i.v. Injektion von C14-Lindan ($3 \mu\text{Ci/kg}$), dargestellt an den spezifischen Aktivitäten der Organe zu den untersuchten Zeitpunkten p.a.

3.3 Veränderungen von stationären Metabolitkonzentrationen unter Lindaneinfluß in Leber und Muskel

Nüchterne Ratten erhielten eine intravenöse Lindaninjektion von 1 mg/kg Körpergewicht. 30, 60 und 180 Minuten p.a. wurden die Tiere getötet und die Konzentrationen von Glucose, Malat, Citrat, Pyruvat und Oxalacetat, Lactat und den freien Aminosäuren in Leber und Muskel bestimmt. Die Kontrollwerte wurden 30 Minuten nach i.v. Injektion von Cremophor ermittelt, um eine durch den Injektionsschock mögliche Verfälschung der Metabolitkonzentrationen lindanbehandelter Tiere zu kompensieren.

Um den Einfluß des Lindans auf die untersuchten Konzentrationen deutlicher hervorzuheben, wurden die nach Lindangabe erhaltenen Werte in Prozent der jeweiligen Kontrollwerte dargestellt (Tab. 3). Als Ergänzung zu den prozentualen Angaben wurden in Tabelle 4 die absoluten Konzentrationen der untersuchten Metabolite in Leber und Muskel unter Normalbedingungen und unter Lindaneinfluß zusammengefaßt.

Die in Tabelle 3 und 4 angegebenen Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen, die aus Versuchsreihen von 5 bis 6 Tieren errechnet wurden. Nach Eliminierung der Ausreißer mit dem Test nach Nalimov (1972) wurden die Werte mit dem Zweistichproben-test von Wilcoxon, Mann und Whitney (1974) überprüft, um den Einfluß des Lindans statistisch abzusichern. Signifikante Unterschiede wurden mit P größer gleich 99 Prozent abgesichert, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit zwischen ein und zehn Prozent wurde eine mehr oder minder ausgeprägte Tendenz zur Veränderung angenommen.

Im Glucosegehalt verursacht Lindan bereits nach 30 Minu-

ten einen sehr ausgeprägten Effekt: sowohl in der Leber als auch im Muskel verringert sich der Glucosespiegel um ungefähr die Hälfte. Im Muskel wird das Glucosedefizit sehr rasch wieder aufgefüllt und zwar in solchem Maße, daß die Rückkehr zum Normalwert über einen "Overshoot" erfolgt. In der Leber dagegen steigt die Glucosekonzentration nur langsam wieder an und liegt auch 3 Stunden nach der Lindaninjektion noch 40 Prozent unter der Norm.

Die Malatkonzentration zeigt in der Leber keine nachweisbaren Veränderungen, während sie im Muskel unter der Wirkung des Insektizids ständig zunimmt und am Ende des Versuches signifikant auf das Dreifache angestiegen ist.

Im Citratgehalt der Leber ist die Abnahme um nahezu 90 Prozent noch drastischer als in der Glucosekonzentration, kann aber wegen der großen Streubreite statistisch nur mit 98 Prozent abgesichert werden. Nach 3 Stunden hat sich der Citratspiegel in der Leber wieder auf sein normales Niveau eingependelt; der Nachschub an Citrat war allerdings so übermäßig, daß die Rückkehr zum Normalwert mit einem "Overshoot" gekoppelt war. Im Muskel zeigt Lindan anfangs keinen Einfluß auf die Citratkonzentration, da sowohl der Kontrollwert als auch die beiden ersten Werte der lindanbehandelten Tiere unter der Nachweisgrenze lagen. Erst nach dreistündiger Wirkungszeit von Lindan kann mit dem unerwarteten Auftreten von $75 \mu\text{g}$ Citrat pro Gramm Frischgewicht im Muskel ein signifikanter Lindaneffekt nachgewiesen werden.

Die Pyruvat/Oxalacetat-Konzentrationen in Leber und Muskel lassen nach Lindaninjektion deutliche Unterschiede zur Kontrollgruppe erkennen. Während im Muskel der Konzentrationsabfall unter die Nachweisgrenze eindeutig ist und bis zum Versuchsende bestehen bleibt, treten im Pyru-

vat/Oxalacetat-Gehalt der Leber mehr oder weniger ausgeprägte Störungen auf, die nach anfänglichem Anstieg ebenfalls zu einer Konzentrationserniedrigung führen, bis Versuchsende aber wieder abgeklungen sind.

Unter dem Einfluß von Lindan erhöht sich die Lactatkonzentration im Muskel sehr stark. Der Effekt ist über die ganze Versuchszeit signifikant. 3 Stunden p.a. ist der Anstieg zwar schon wieder rückläufig, die Werte liegen aber immer noch 100 - 200 Prozent über dem Normalwert. In der Leber verändert sich der Lactatgehalt unter Lindaneinwirkung nicht.

Auch die ninhydrinpositiven Substanzen, die zum überwiegenden Teil aus freien Aminosäuren bestehen, bleiben offenbar in Leber und Muskel von Lindan unbeeinflusst. Alle ermittelten Normalwerte liegen innerhalb der Toleranzgrenze der für unbehandelte Tiere angegebenen Literaturwerte (BERGMEYER, 1962; BILLMEIER, 1977). Der Injektionsschock verursacht offensichtlich keine Änderung in den untersuchten Metabolitkonzentrationen.

Insgesamt gesehen greift Lindan viel stärker in den intermediären Stoffwechsel des Muskels als in den der Leber ein, obwohl in der Leber weit mehr Lindan angereichert ist. In allen untersuchten Metabolitkonzentrationen im Muskel, mit Ausnahme der freien Aminosäuren und der Glucose, konnten signifikante lindanbedingte Veränderungen nachgewiesen werden, während in der Leber nur die Glucoseabnahme unter Lindaneinfluß statistisch gesichert werden konnte. Zudem sind die Lindaneffekte in der Leber generell nach drei Stunden abgeklungen, im Muskel dagegen verstärken sich die Effekte außer in Glucose und Lactat bis zum Versuchsende.

Tabelle 3: Lindaneinfluß auf den Metabolitspiegel in Leber und Muskel der Ratte.
Angaben in Prozent der Kontrollwerte *, Lindaninjektion: 1 mg/kg i.v.

L F B E R	Kontrolle		30 min p.a.		60 min p.a.		180 min p.a.	
	$\bar{x} \pm s$ (n)	P (%)	$\bar{x} \pm s$ (n)	P (%)	$\bar{x} \pm s$ (n)	P (%)	$\bar{x} \pm s$ (n)	P (%)
Glucose	100 $\pm$ 34 (5)	99	40 $\pm$ 18 (5)	99	51 $\pm$ 13 (6)	98-99	61 $\pm$ 18 (5)	80-90
Malat	100 $\pm$ 42 (5)	<80	82 $\pm$ 12 (4)	<80	132 $\pm$ 7 (6)	<80	107 $\pm$ 22 (5)	<80
Citrat	100 $\pm$ 41 (5)	98	12 $\pm$ 12 (5)	98	194 $\pm$ 53 (6)	98	65 $\pm$ 41 (5)	<80
Lactat	100 $\pm$ 20 (5)	<80	84 $\pm$ 30 (5)	<80	89 $\pm$ 19 (6)	<80	84 $\pm$ 25 (5)	<80
Pyr/Oa**	100 $\pm$ 24 (5)	90-95	150 $\pm$ 38 (5)	90-95	32 $\pm$ 16 (6)	98-99	78 $\pm$ 30 (5)	<80
Aminosr.	100 $\pm$ 17 (5)	<80	110 $\pm$ 32 (5)	<80	108 $\pm$ 7 (6)	<80	131 $\pm$ 21 (5)	90
M U S K E L								
Glucose	100 $\pm$ 25 (5)	98	53 $\pm$ 12 (5)	98	235 $\pm$ 126 (6)	90	96 $\pm$ 34 (5)	<<80
Malat	100 $\pm$ 71 (5)	80	178 $\pm$ 50 (5)	80	257 $\pm$ 50 (6)	98-99	321 $\pm$ 64 (5)	99
Citrat	100 $\pm$ 0 ⁺ (5)	0	100 $\pm$ 0 ⁺ (5)	0	100 $\pm$ 0 ⁺ (5)	0	>100 ⁺⁺ (5)	99
Lactat	100 $\pm$ 30 (5)	99	246 $\pm$ 56 (5)	99	505 $\pm$ 152 (6)	>99	266 $\pm$ 47 (5)	99
Pyr/Oa**	100 $\pm$ 39 (5)	99	0 ⁺ (5)	99	0 ⁺ (6)	>99	0 ⁺ (5)	99
Aminosr.	100 $\pm$ 17 (5)	<80	105 $\pm$ 17 (5)	<80	97 $\pm$ 10 (6)	<80	118 $\pm$ 17 (5)	<80

*: $\bar{x}$ s Mittelwert u. Standardabweichung, (n) Anzahl der Versuchstiere, P (%) statistische Sicherheit, **: Pyruvat/Oxalacetat

+ : Werte unter der Nachweisgrenze, ++: nicht berechenbar, weil Kontrollwert unter der Nachweisgrenze

Tabelle 4: Konzentrationsveränderungen der untersuchten Metabolite in Leber und Muskel der Ratte nach intravenöser Lindaninjektion (1 mg/kg)
Mittelwerte und Standardabweichungen der Konzentrationen in $\mu\text{Mol/g}$ Frischgewicht

Metabolit	Versuchs- gruppe	<u>LEBER</u> $\mu\text{Mol/g}$ FG	<u>MUSKEL</u> $\mu\text{Mol/g}$ FG
GLUCOSE	Kontrolle	$22,9 \pm 7,9$	$2,2 \pm 0,6$
	30 min p.a.	$9,2 \pm 4,1$	$1,2 \pm 0,3$
	60 min p.a.	$11,8 \pm 2,9$	$5,2 \pm 2,3$
	180 min p.a.	$13,9 \pm 4,2$	$2,1 \pm 0,8$
MALAT	Kontrolle	$0,30 \pm 0,13$	$0,10 \pm 0,07$
	30 min p.a.	$0,25 \pm 0,04$	$0,19 \pm 0,05$
	60 min p.a.	$0,40 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,05$
	180 min p.a.	$0,32 \pm 0,07$	$0,43 \pm 0,07$
CITRAT	Kontrolle	$0,09 \pm 0,04$	u.N.*
	30 min p.a.	$0,01 \pm 0,01$	u.N.
	60 min p.a.	$0,17 \pm 0,05$	u.N.
	180 min p.a.	$0,06 \pm 0,04$	$0,08 \pm 0,03$
LACTAT	Kontrolle	$5,2 \pm 1,0$	$3,6 \pm 1,1$
	30 min p.a.	$4,4 \pm 1,6$	$8,3 \pm 2,0$
	60 min p.a.	$4,6 \pm 1,0$	$18,1 \pm 5,4$
	180 min p.a.	$4,3 \pm 1,3$	$9,5 \pm 1,7$
PYRUVAT/ OXALACETAT	Kontrolle	$0,11 \pm 0,03$	$0,09 \pm 0,03$
	30 min p.a.	$0,17 \pm 0,04$	u.N.
	60 min p.a.	$0,04 \pm 0,02$	u.N.
	180 min p.a.	$0,09 \pm 0,03$	u.N.
AMINO- SÄUREN**	Kontrolle	$12,3 \pm 2,1$	$14,9 \pm 2,5$
	30 min p.a.	$13,5 \pm 3,9$	$15,6 \pm 2,6$
	60 min p.a.	$13,3 \pm 0,9$	$14,5 \pm 1,5$
	180 min p.a.	$16,2 \pm 2,5$	$17,6 \pm 2,6$

*: u.N. = unter der Nachweisgrenze, **: mittleres MG = 130,5

3.4 Oxidativer Abbau des Lactats unter Lindaneinfluß

Um zu klären, ob die durch Lindaneffekt erhöhte Milchsäurekonzentration im Muskel auch mit einem vermehrten Milchsäureabbau über den Citratzyklus verbunden ist, wurde die Aktivität im ausgeatmeten CO_2 nach intravenöser Applikation von C^{14} -markiertem Lactat bestimmt.

Die Untersuchungen wurden an Tieren durchgeführt, denen 30 Minuten bzw. 2 Stunden vor der Lactatinjektion 1 mg Lindan pro kg Körpergewicht intravenös injiziert wurde, und an Kontrolltieren, die 30 Minuten vor der Lactatgabe eine Cremophorinjektion erhielten, damit auch sie einem zweimaligen Injektionsschock ausgesetzt waren. Die Lactatdosis betrug pro Tier 2 μMol , die C^{14} -Aktivität rund 3 μCi . Über einen Zeitraum von 3 Stunden nach der Lactatinjektion wurde die im CO_2 enthaltene C^{14} -Aktivität bestimmt. Tabelle 5 zeigt die unter Normalbedingungen und unter Lindaneinfluß erhaltenen Werte in Prozent der injizierten Aktivitätsdosis.

Wie aus den Ergebnissen ersichtlich, fand bei den Tieren, die 30 bzw. 120 Minuten vor der Lactatgabe eine relativ gering dosierte Lindaninjektion erhalten hatten, kein erhöhter Milchsäureverbrauch über den Citratzyklus statt. Nach der 30-minütigen Wirkungszeit von Lindan zeigt sich vielmehr eine deutliche Hemmung der CO_2 -Bildung aus Lactat, die 3 Stunden nach Beginn des Experiments mit einer Wahrscheinlichkeit von über 99 Prozent als gesichert angesehen werden kann.

Betrachtet man den Verlauf des oxidativen Lactatabbaus nach einer Lindaneinwirkung von 2 Stunden, so liegen die Ergebnisse zwar alle unter den Normalwerten der Lactatveratmung, die gehemmte Reaktion unter Lindaneinfluß kann

aber wegen der größeren Streuung statistisch nicht mehr abgesichert werden. Aus diesem Grund wurden die Werte 2 Stunden nach Lindanvorgabe nicht in die kinetischen Überlegungen miteinbezogen, obwohl sie meiner Meinung nach auch für diese Reaktion noch Gültigkeit besitzen. Gegenüber der kürzeren Wirkungszeit von Lindan erscheint die C14-Incorporation in CO_2 weniger stark gehemmt, was wahrscheinlich auf ein Abklingen des Lindaneffekts hindeutet.

Tabelle 5: Lactatabbau zu CO_2 nach i.v.Injektion von C14-Lactat ($3 \mu\text{Ci}/\text{Ratte}$) unter Normalbedingungen und unter der Einwirkung einer einmaligen Lindangabe (1 mg/kg i.v.), die 30 bzw. 120 Minuten vor der Lactatinjektion verabreicht wurde
Mittelwerte und Standardabweichungen der in CO_2 incorporierten C14-Aktivität in Prozent der injizierten Aktivität

t [Std nach Lactatgabe]	Kontrolle n = 3	30 min nach Lindangabe n = 5	120 min nach Lindangabe n = 3
0,5	9 ± 2	5 ± 1 **	7 ± 4
1,0	18 ± 2	14 ± 3	16 ± 6
1,5	26 ± 2	-	22 ± 2
2,0	33 ± 3	27 ± 2 *	28 ± 5
2,5	40 ± 1	-	32 ± 5
3,0	46 ± 2	34 ± 1 **	35 ± 5

* $P = 95 - 99 \%$, ** $P \geq 99 \%$

Um eine mathematische Gesetzmäßigkeit für den oxidativen Lactatabbau unter Normalbedingungen und 30 Minuten nach Lindaninjektion zu finden, wurde der natürliche Logarithmus des nicht zu CO_2 abgebauten C14-Lactats in Prozent der injizierten Aktivität gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 5). Die Regressionsanalyse ergab unter beiden Voraussetzungen eine lineare Beziehung, d.h. der C14-Lactatspiegel im Gesamttier verläuft exponentiell nach folgender Funktion

$$f(t) = a \cdot e^{-k_{21} \cdot t} \quad (\text{DOST, 1968})$$

Dabei entspricht a der Anfangskonzentration des C14-Lactats im Körper, in diesem Fall 100 Prozent, während die Eliminationskonstanten k_{21} durch die Steigungen der Regressionsgeraden definiert sind. Sie wurden aus der halb-logarithmischen Darstellung (Abb. 5) graphisch ermittelt bzw. nach Gleichung (6) von 3.1 für t in Stunden berechnet mit:

$$k_{21}(K) = -0,206 \text{ [h}^{-1}\text{]} \text{ für die Kontrollwerte und}$$

$$k_{21}(L30) = -0,145 \text{ [h}^{-1}\text{]} \text{ nach 30 Minuten Lindanvor-}$$

gabe. Mit den erhaltenen Werten kann der C14-Lactatspiegel im Gesamttier für die Kontrollwerte mit der Funktion

$$f_K(t) = 100 \cdot e^{-0,206 \cdot t} \text{ [\%]}$$

beschrieben werden, für den Verlauf der C14-Lactatkonzentration unter Lindaneinfluß im Körper erhält man

$$f_{L30}(t) = 100 \cdot e^{-0,145 \cdot t} \text{ [\%]}.$$

Die biologische Halbwertszeit gibt den Zeitraum an, in dem gerade die Hälfte einer in den Organismus gebrachten Substanz ausgeschieden worden ist. Sie wird durch die Formel

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{21}} \quad \text{bestimmt (DOST, 1968).}$$

Um die Halbwertszeit auch für die zweistündige Lindanvorgabe berechnen zu können, wurde die Eliminationskonstante zumindest rechnerisch ermittelt ($-0,158 \text{ [h}^{-1}\text{]}$). Für die Halbwertszeit der Lactatveratmung erhält man 3,36 Std, nach 30 Minuten Lindanvorgabe erhöht sich die Halbwertszeit auf 4,78 Std und nach 2 Stunden Lindaneinwirkung beträgt sie noch 4,39 Stunden.

Die Summe der im Körper verbliebenen und der zur CO_2 -Bildung verbrauchten Lactatmenge ist zu jedem Zeitpunkt 100 Prozent. Die CO_2 -Bildung verläuft daher nach der Funktion

$$f_{\text{CO}_2}(t) = 100 (1 - e^{-k_{21} \cdot t}) \quad [\% \text{ der Gesamtaktivit}]$$

Wie aus Abbildung 5 ersichtlich stimmen die theoretischen Kurven mit den experimentell ermittelten Daten überein.

Unter den hier gewählten Normalbedingungen werden also rund 18 Prozent des im Körper vorhandenen Lactats in der Stunde oxidativ abgebaut, d.h. zur Energiegewinnung herangezogen. Nach halbstündlichem Lindaneinfluß verringert sich der Lactatverbrauch über den Citratzyklus, trotz erhöhtem Lactatangebot aus dem Muskel, signifikant um 25 Prozent. Läßt man Lindan 2 Stunden bis zur Lactatzuführung einwirken, so kann man einen gesicherten Lindaneinfluß nicht mehr nachweisen. Aus der Halbwertszeit für den oxidativen Lactatabbau von 4 Stunden 23 Minuten erkennt man jedoch, daß der Effekt in abgeschwächter Form noch wirksam ist. Nach kurzfristiger Verweildauer im Körper verursacht Lindan eine Verlängerung der Halbwertszeit um 1 Stunde 25 Minuten, d.h. eine Zunahme von über einem Drittel.

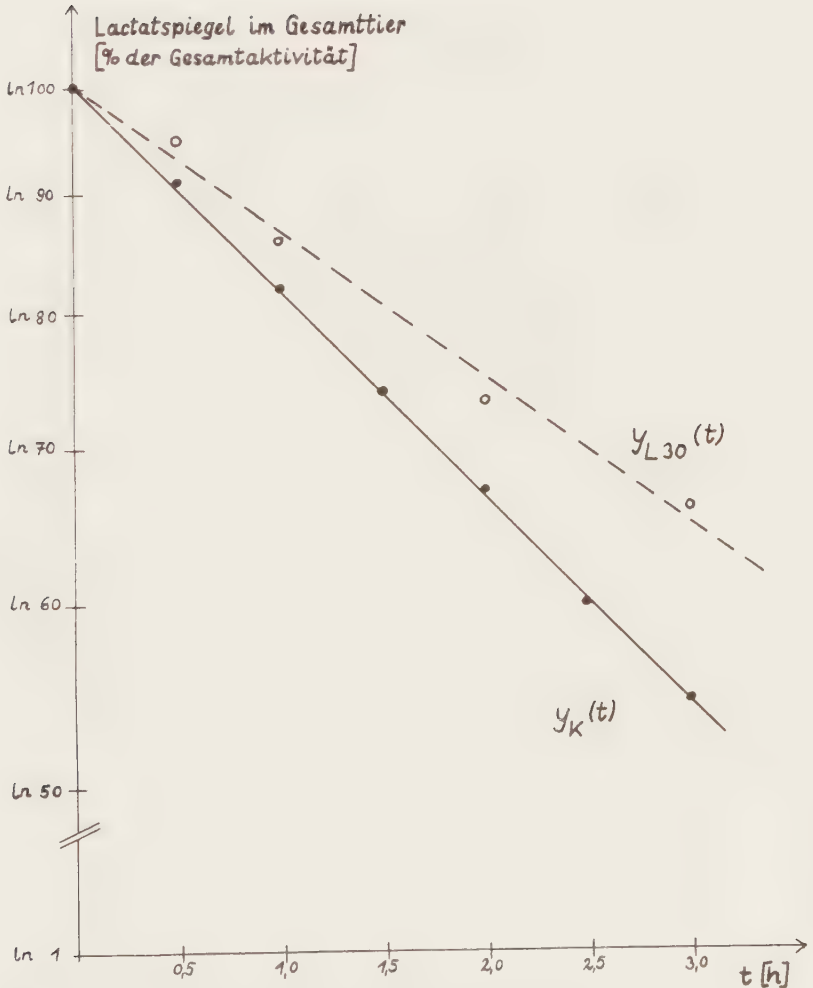


Abb. 5: Halblogarithmische Darstellung des oxidativen Lactatabbaus $f(t) = \ln (C^{14}\text{-Lac} - {}^{14}\text{CO}_2)$ bei der Ratte nach i.v. Injektion von C^{14} -Lactat ($3 \mu\text{Ci/Tier}$)

$y_K(t)$ Regressionsgerade für Kontrolltiere ● — ●
 $y_{L30}(t)$ Regressionsgerade für lindanbelastete Tiere (1 mg Lindan/kg i.v. 30 min vor Lactatgabe) ○ — — ○

3.5 Einfluß einer subletalen Lindangabe auf das Schicksal von C14-markierter Glucose

Gleichzeitig mit der C14-markierten Glucose (~ 1 mCi/kg) wurde den Versuchstieren eine subletale Lindandosis von ~ 6 mg/kg intravenös injiziert, für den Kontrollversuch wurden Tiere aufgearbeitet, die nur die radioaktive Glucose in der o.a. Dosis erhalten hatten. Als Versuchstiere dienten Mäuse (Stamm NRMI, ♂♂, Gewicht 25 g), deren geringes Gewicht die Applikation der erforderlichen, hohen Aktivitätsdosis von 1 μ Ci pro Gramm Körpergewicht in Grenzen hielt. Die Ergebnisse wurden aus zwei Tieren je Versuchsgruppe ermittelt.

5 Stunden p.a. wurden die Tiere getötet und die C14-Aktivität in den Ausscheidungsprodukten CO_2 , Harn und Kot bestimmt. Die Kontrolltiere eliminierten 2,8 Prozent der Gesamtaktivität mit dem Harn, 0,8 Prozent im Kot und 63 Prozent über CO_2 . Bei den lindanbelasteten Tieren erreichte die Glucoseausscheidung über die drei Ausscheidungsprodukte annähernd den gleichen Prozentsatz (Harn 2,4% - Kot 0,9% - CO_2 58%). Berechnet man die geschwindigkeitsbestimmende Konstante k_{21} für die mittlere Glucoseelimination über CO_2 aus den beiden Meßpunkten zur Zeit $t = 0$ und $t = 5$ Stunden, so erhält man mit $k_{21} = -0,19 \text{ h}^{-1}$ annähernd die gleiche Eliminationskonstante wie für die CO_2 -Bildung aus Lactat beim Normaltier (vergl. 3.4).

Vergleicht man die Organverteilung der injizierten C14-Glucose 5 Stunden p.a. mit den Werten unter Lindaneinfluß (Tab. 6), so kann man außer in Leber und Herz keinen Unterschied feststellen. In der Leber bewirkt die Lindangabe eine um 70 Prozent erhöhte Aktivitätsspeicherung, während sich der Glucoseeinbau im Herzen unter Lindaneinfluß verdoppelt.

Tabelle 6: Lindaneinfluß auf die Organverteilung und Anreicherung der C14-Aktivität bei der Maus, 5 Stunden nach Injektion von C14-markierter Glucose (25 μ Ci/Versuchstier i.v.) und Lindan (6 mg/kg i.v.)

Angaben in Prozent der Gesamtaktivität (%)
und in Anreicherungsfaktoren (ARF, def.wie 3.2)
Mittelwerte aus 2 Tieren je Versuchsgruppe

Organ	Kontrolle		Lindangabe	
	%	ARF	%	ARF
Leber	0,99	0,50	1,72	0,74
Gehirn	0,29	0,49	0,32	0,45
Nieren	0,29	0,52	0,26	0,47
Herz	0,13	0,92	0,26	1,41
Milz	0,16	1,09	0,17	1,12
Pankreas	0,22	0,79	0,23	0,82
Blut	0,40	0,27	0,38	0,22
Muskulatur	14,7*	1,32	12,7*	0,98

*) Die Gesamtmuskulaturmenge wurde nach Vergleichswerten von der Ratte (SEIDLER et al., 1975) näherungsweise mit einem Drittel vom Körpergewicht bestimmt

Der größte Anteil der C14-Glucose bzw. der C14-Metaboliten befindet sich in der Muskulatur, deren Gesamtmenge mit 33 Prozent vom Körpergewicht nach Vergleichswerten von der Ratte (SEIDLER et al., 1975) geschätzt wurde. Unter Normalbedingungen ist im Muskel auch die höchste spezifische Aktivität zu verzeichnen. Eine Korrektur für den Blutanteil der Organe wurde nicht durchgeführt, weil sich der C14-Anteil mit 0,3 Prozent der Gesamtaktivität pro

ml Blut unter Lindanbelastung nicht verändert, und der Fehler deshalb bei einem Vergleich zwischen zwei Versuchsgruppen vernachlässigt werden kann.

Setzt man die Anreicherung der C14-Aktivität als Bezugsgröße ein, so kann man in der Kontrollgruppe feststellen, daß die Anreicherung der C14-Glucose in Herz, Milz, eventuell auch in Pankreas und im Muskel, einer angenommenen Gleichverteilung entspricht, während die C14-Anreicherung in Leber, Gehirn und Niere um die Hälfte geringer ist. Bei den lindanbelasteten Tieren weist das Herz mit einem Anreicherungsfaktor von 1,4 die höchste Glucoseanreicherung auf. Gegenüber der Kontrollgruppe ist die Anreicherung, wie auch in der Leber, um 50 Prozent gestiegen. Die Anreicherungsfaktoren der anderen Organe verhalten sich entsprechend der Kontrollgruppe.

Um den Stoffwechsel der Glucose unter Lindaneinwirkung zu verfolgen, wurden die einzelnen Organe nach dem angegebenen Verfahren chemisch aufgetrennt. Man erhält drei flüssige Fraktionen, in denen der gesamte Stoffbestand gelöst ist und deren C14-Aktivität ein Maß für die Glucoseincorporation in die betreffenden Verbindungen ist. Im Chloroform-Methanol-Wasser-Gemisch (Fraktion 1) sind die Lipide, die Lipoproteine und die niedermolekularen Substanzen gelöst, in der Perchlorsäure (Fraktion 2) im Wesentlichen die säurelöslichen Polysaccharide, und in der Salzsäure (Fraktion 3) die mit HClO_4 fällbaren Proteine. In Tabelle 7 sind die Werte für die Glucoseincorporation in diese drei Fraktionen der Organe zusammengefaßt. Sie wurden in Prozent der injizierten Aktivität pro Gramm Organ angegeben, um gleichzeitig einen Vergleich der Einbauraten zwischen den Organen zu ermöglichen.

Unter Lindaneinwirkung zeigen sich in Leber und Herz

Veränderungen, während der Einbau in die Stoffklassen von Niere, Gehirn, Milz, Pankreas und Muskel unbeeinflusst bleibt.

Tabelle 7: Lindaneinwirkung auf die Glucoseincorporation in Lipide, Lipoproteine und niedermolekulare Substanzen (Fraktion 1), in Polysaccharide (Fraktion 2) und in Proteine (Fraktion 3) der Organe bei der Maus, 5 Stunden nach i.v.-Injektion von C14-Glucose (1 mCi/kg) und Lindan (6 mg/kg)

Angaben in Prozent der Gesamtaktivität pro Gramm Organ, K = Kontrollversuch, L = bei gleichzeitiger Lindangabe

Organ	Fraktion 1		Fraktion 2		Fraktion 3	
	K	L	K	L	K	L
Leber	0,30	0,66	0,038	0,15	0,34(2,2)*	0,33(2,1)*
Niere	0,39	0,39	0,038	0,042	0,27(2,6)	0,29(2,5)
Gehirn	0,46	0,44	0,022	0,022	0,17(2,4)	0,22(2,3)
Herz	1,01	1,91	0,029	0,067	0,18(1,1)	0,19(1,3)
Milz	0,70	0,81	0,30	0,37	0,45(3,2)	0,52(3,7)
Pankreas	0,74	0,89	0,076	0,10	0,22(2,3)	0,28(3,1)
Muskel	1,50	1,22	0,14	0,16	0,15(1,3)	0,12(1,1)

*) spezifische Aktivität der Proteine in Prozent der Gesamtaktivität pro Gramm Protein

Der größte Anteil der in den Organen vorhandenen C14-Aktivität findet sich in der Gruppe der Lipide, Lipoproteine und Niedermolekularen. Für diese Fraktion variiert die Einbaurrate der C14-Glucose in den untersuchten Organen

beträchtlich. In Leber und Herz ist ein gleichgerichteter Lindaneffekt erkennbar: Die Incorporation von C¹⁴-Glucose steigert sich unter dem Einfluß einer subletalen Lindangabe in der Leber um 120 Prozent, im Herzen um 90 Prozent.

Unter Normalbedingungen werden in die Polysaccharidfraktion von Leber, Niere, Gehirn und Herz rund 0,03 Prozent der injizierten Glucose eingebaut (= 15000 ipm bei einer Dosis von 25 μ Ci), in Pankreas, Muskel und Milz zwischen 0,1 und 0,3 Prozent pro Gramm Organ. Durch die Lindanbelastung nimmt die Glucoseincorporation in das Glykogen der gesamten Leber von 0,056 auf 0,223 Prozent der Gesamtaktivität zu, das entspricht einer Steigerung der Einbaurrate um 300 Prozent. Im Herz ist ein Zuwachs des Glucoseeinbaus ins Glykogen um 130 Prozent zu verzeichnen.

Die Incorporation von C¹⁴-Glucose in die Organproteine bleibt unter Lindaneinwirkung unverändert. Mit dem nach Folin bestimmten Proteingehalt der Organe konnte die spezifische Aktivität der Proteine berechnet werden (Tab. 7). Sie beträgt pro Gramm Protein zwischen 1,1 und 3,7 Prozent der Gesamtaktivität , entsprechend 600000 - 2100000 dpm/g Protein. Mit der Bestimmung der spezifischen Aktivität der Proteine konnte zwar festgestellt werden, daß der Glucoseeinbau in die Proteine von einer Lindanvergiftung unberührt bleibt, es konnte jedoch nicht geklärt werden, ob die Aminosäuresynthese aus Glucose bzw. Glucosemetaboliten durch Lindan gestört wird.

Um diese Frage beantworten zu können, wurden die Proteine der Leber, stellvertretend für die ganze Organgruppe, hydrolysiert und das Aminosäuregemisch über einen Aminosäure-Analysator aufgetrennt. Die C¹⁴-Aktivität und die Menge der isolierten Aminosäuren wurden bestimmt, um ihre spezifische Aktivität zu berechnen. In Abbildung 6 wurde

der Glucoseeinbau in die proteingebundenen Aminosäuren von Kontrolltieren dem von lindanbelasteten Tieren gegenübergestellt. Gleichzeitig wurde die Aminosäuren-Zusammensetzung des Gesamtleberproteins dargestellt. Bei der Interpretierung der spezifischen Aktivitäten muß darauf hingewiesen werden, daß der Aktivitätsverlust bei der Auftrennung im Analysator und der anschließenden C14-Bestimmung mit rund 50 Prozent außerordentlich hoch war. Zusammen mit den geringen Mengen der im Mikrogrammbereich analysierten Aminosäuren können eigentlich nur die Aussagen über Glutaminsr, Alanin, Asparaginsr. u. Arginin, eventuell noch Serin und Glycin als gesichert angesehen werden. Die genannten Aminosäuren repräsentieren mengenmäßig rund 50 Prozent der im Leberprotein gebundenen Aminosäuren (Abb. 6.2) und enthalten etwa 85 Prozent der im Leberprotein wiedergefundenen C14-Aktivität.

Bei den Kontrollwerten fand man die höchste Glucoseincorporation im Alanin, Glutaminsr, Asparaginsr, Arginin und erstaunlicherweise im Tyrosin. Die geringsten spezifischen Aktivitäten wiesen Glycin, Serin und Cystein auf. Unerklärlicherweise war im Methionin von einem Kontrolltier und einem lindanbelasteten Tier ein Glucoseeinbau, vergleichbar mit dem des Cysteins, zu verzeichnen.

Unter Lindaneinfluß nahm die Glucoseincorporation in Cystein, Alanin, Tyrosin und Threonin zu, während die spezifischen Aktivitäten von Glutaminsr. u. Prolin zurückgingen. (Abb. 6.1). Die in den essentiellen Aminosäuren Threonin und Methionin, sowie die im Tyrosin, das nur aus einer essentiellen Aminosäure metabolisiert werden kann, gemessenen C14-Aktivitäten waren so gering, daß es sich dabei möglicherweise um C14-Verunreinigungen aus unscharfen Fraktionstrennungen handeln kann. Einigermaßen sicher

erscheint dagegen die leicht vermehrte Alaninsynthese aus C14-Glucose über Pyruvat und die ungefähr um den gleichen Prozentsatz verringerte Glutamatbildung aus α -Ketoglutarat-(C14) unter Lindaneinfluß in der Leber.

Um zu überprüfen, ob dieser Lindaneffekt speziell in der Leber auftritt, wurden die spezifischen Aktivitäten der proteingebundenen Glutaminsäure bei den restlichen Organen untersucht (Tab. 8). Eine durch Lindangabe geringfügig verminderte C14-Incorporation konnte außer in der Leber auch in Gehirn und Muskel festgestellt werden, in der Niere war dagegen ein leichter Anstieg der spezifischen Aktivität zu verzeichnen. Bei diesen Untersuchungen lag der Aktivitätswiederfund mit 67 ± 5 Prozent im Mittel etwas günstiger als bei der vollständigen Aminosäure-Analyse.

Tabelle 8: Vergleich der C14-Incorporation in die protein-gebundene Glutaminsäure verschiedener Organe der Maus 5 Stunden nach C14-Glucose-Injektion (1 mCi/kg) von Kontrolltieren mit lindanbelasteten Tieren (6 mg/kg i.v.)

Angaben der spezifischen Aktivität in Prozent der Gesamtaktivität mal 10^{-3} pro mg Glutaminsäure

Organ Gruppe	Leber	Niere	Gehirn	Herz	Milz	Pankreas	Muskel
Kontrolle	4,30	5,59	5,91	2,68	6,78	5,95	2,33
Lindangabe	3,31	6,68	4,62	2,26	7,29	5,21	1,94

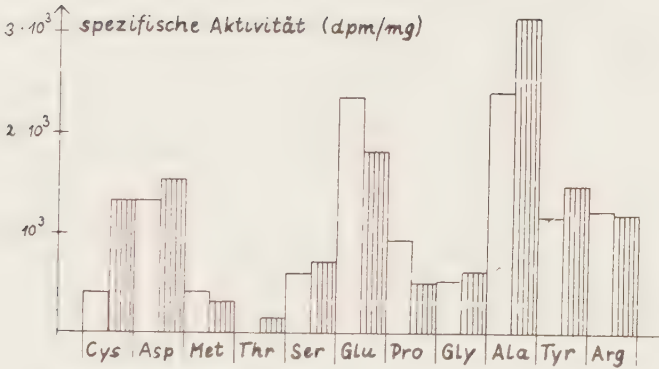


Abb. 6.1: Lindaneinfluß auf die Aminosäuresynthese aus C^{14} -markierter Glucose ($25 \mu\text{Ci}/\text{Tier}$) in der Leber der Maus (5Std p.a.)

Angaben der spezifischen Aktivität unter Normalbedingungen $\square$, und unter Lindanbelastung (6 mg/kg) ▨

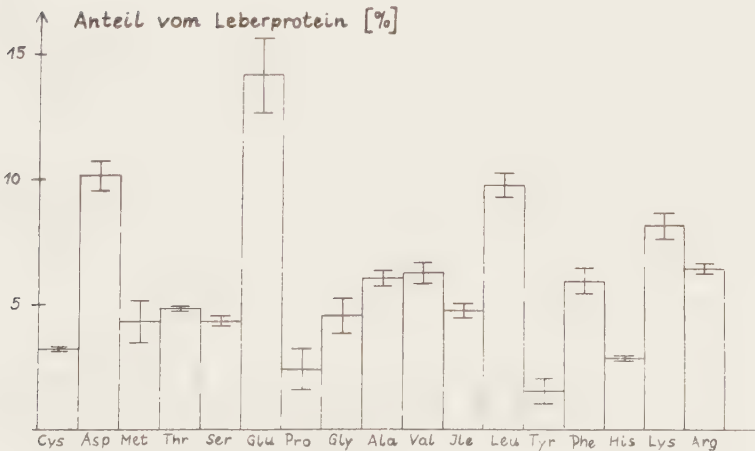


Abb. 6.2: Aminosäurezusammensetzung des Leberproteins bei der Maus

Prozentuale Angaben der Mittelwerte und Standardabweichungen aus 5 Versuchen

3.6 Lindanwirkung auf die Aktivität der respiratorischen Enzyme Cytochromoxidase und Succinatdehydrogenase in Leber und Muskel

Die unter Lindaneinfluß signifikanten Veränderungen der Konzentrationen von Citrat, Malat und Oxalacetat/Pyruvat im Muskel sind möglicherweise Sekundäreffekte einer lindanbedingten Störung der Endoxidation, zumal bei Insekten ein inaktivierender Einfluß des Lindans auf die zwei respiratorischen Enzyme Succinatdehydrogenase und Cytochromoxidase in vitro nachgewiesen werden konnte (MORRISON & BROWN, 1954 und ZAKOLODKINA, 1963). Mit der Aktivitätsbestimmung dieser beiden Enzyme in Leber und Muskel der Ratte nach einmaliger Lindaninjektion wurde überprüft, ob dieser Effekt auch bei Säugetieren auftritt.

Tabelle 9 zeigt die aus 4 bis 6 Versuchen berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen der untersuchten Enzyme. Wie aus den Standardabweichungen ersichtlich, war eine relativ starke Streuung der Einzelwerte zu verzeichnen, die nur teilweise mit der individuellen Variabilität der Versuchstiere zu begründen ist. Wahrscheinlich ist die große Streuungsbreite eine Folge der Anfälligkeit der Enzymaktivitäten gegenüber äußeren Einflüssen, wie beispielsweise Temperaturunterschieden und Konzentrations- und pH-Schwankungen während der Aufbereitung und Bestimmung. Die unter Kontrollbedingungen erhaltenen Reaktionsgeschwindigkeiten der beiden untersuchten Enzyme stimmen jedoch größenordnungsmäßig mit vergleichbaren Literaturwerten (BILLMEIER, 1977 und RAUEN, 1964) überein.

Die Ergebnisse gaben keinen Hinweis auf einen gestörten Ablauf der Atmungskette. Obwohl die Aktivität der Succinatdehydrogenase in Leber und Muskel größere Schwankungen unter Lindaneinfluß zeigt - bei konstanten Cytochromoxidase-

werten - weist die statistische Auswertung für beide Enzyme keinen signifikanten Unterschied zum Kontrollkollektiv nach. Unter den vorgegebenen Bedingungen konnte ein Lindaneffekt auf die Reaktionsgeschwindigkeiten der beiden respiratorischen Enzyme weder im Muskel noch in der Leber der Ratte festgestellt werden.

Tabelle 9: Aktivitäten der Cytochromoxidase (EC.1.9.3.1) und Succinatdehydrogenase (EC.1.3.99.1) in Leber und Muskel der Ratte unter Normalbedingungen und 30 u. 120 Minuten nach Lindaninjektion (1 mg/kg i.v.)

Aktivitätsangaben in U/g Frischgewicht

$\bar{x}$ Mittelwert, s Standardabweichung, (n) Anzahl der Versuche

LEBER	Cytochromoxidase $\bar{x} \pm s$ (n)	Succinatdehydrogenase $\bar{x} \pm s$ (n)
Kontrolle	1,60 $\pm$ 0,40 (6)	0,50 $\pm$ 0,17 (6)
30 min p.a.	1,66 $\pm$ 0,30 (6)	0,59 $\pm$ 0,04 (6)
120 min p.a.	1,67 $\pm$ 0,63 (6)	0,73 $\pm$ 0,20 (6)
MUSKEL		
Kontrolle	0,99 $\pm$ 0,48 (5)	0,45 $\pm$ 0,20 (6)
30 min p.a.	0,90 $\pm$ 0,21 (4)	0,29 $\pm$ 0,09 (4)
120 min p.a.	0,92 $\pm$ 0,30 (6)	0,45 $\pm$ 0,21 (6)

3.7 Lindaneffekt auf die Aktivität der Acetylcholinesterase im Gehirn von Mäusen

Im Gehirn von Mäusen wurde 30 Sekunden nach einer intravenösen Cremophorinjektion die Aktivität der Acetylcholinesterase (EC.3.1.1.7) mit $2,2 \pm 0,04$ U/g Frischgewicht ($n = 3$) bestimmt. Bei Tieren, die 30 Sekunden nach i.v. Injektion einer subletalen Lindandosis ($7,15$ mg/kg) zu Beginn des Krampfanfalls getötet wurden, war die Acetylcholinesteraseaktivität im Gehirn mit $1,83 \pm 0,1$ U/g ($n=4$) signifikant erniedrigt. Nach einer hochletalen Lindangabe von $36,25$ mg/kg, an der die Tiere ungefähr 30 Sekunden p.a. im Krampf starben, war die Aktivität mit $1,36 \pm 0,23$ U/g Gehirn ($n=3$) auf rund 60 Prozent der unter Normalbedingungen ermittelten Werte gesunken.

Diese Ergebnisse sind zusammen mit den Vergiftungserscheinungen des Lindans ein eindeutiger Hinweis, daß Lindan in irgendeiner Form in den Mechanismus der cholinergen Reizübertragung eingreift.

Um den Lindaneinfluß näher zu bestimmen, wurde zunächst die Reaktionsgeschwindigkeit der normalerweise im Gehirn vorhandenen Acetylcholinesterase in Abhängigkeit von der Substratkonzentration getestet. Die schrittweise Erhöhung der Substratkonzentration von 5 auf $5 \cdot 10^2$ $\mu\text{Mol/l}$ hat einen raschen Anstieg der Enzymaktivität im Gehirnextrakt von $0,3$ auf 2 μMol Substratumsatz pro Minute und Gramm Gehirn zur Folge. Bei einer Substratkonzentration zwischen $5 \cdot 10^2$ und $5 \cdot 10^3$ bleibt die Reaktionsgeschwindigkeit nahezu konstant, das Enzym ist offenbar gesättigt. Erhöht man die Substratkonzentration noch weiter auf 10^4 $\mu\text{Mol/l}$, so nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit wieder ab. Das Enzym reagiert mit der für Acetylcholinesterase typischen Substratüberschußhemmung (AUGUSTUNSSON & NACHMANSOHN, 1949),

durch die es sich von den unspezifischen Cholinesterasen unterscheidet (GOEDDE et al., 1967).

Der genaue Wert der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit $v_{\max}$ sowie die Michaeliskonstante K_m , die die Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit angibt, wurden durch die Auftragung der reziproken Werte $1/v$ gegen $1/[S]$ im LINEWEAVER-BURK-Diagramm bestimmt (Abb. 7). Unter den angegebenen Bedingungen erhält man für $v_{\max}$ 2,041 μMol pro Minute im Gramm Gehirn und für K_m die Konzentration von $4,2 \cdot 10^{-5}$ Mol/l.

Der Lindaneffekt auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Acetylcholinesterase wurde durch die Zugabe von drei unterschiedlich konzentrierten Lindanlösungen bei variabler Substratkonzentration in vitro überprüft. Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei Untersuchungen sind in Tabelle 10 mit den Ergebnissen der Kontrollversuche zusammengefaßt.

Bei einer 5 millimolaren Substratkonzentration bewirkt die Lindanzugabe eine eindeutige Hemmung der Enzymaktivität, die mit Erhöhung der Lindankonzentration zunimmt: Bei einer Lindankonzentration von $7,6 \cdot 10^{-2}$ mMol/l im Test wird die Aktivität um 35 Prozent gehemmt, bei der doppelten Lindankonzentration um 55 Prozent und bei der dreifachen Konzentration um 75 Prozent. Verringert man die Substratkonzentration um die Hälfte, so nimmt die inaktivierende Wirkung des Lindans auf die Acetylcholinesterase ab: Nach Zusatz der einfachen Lindankonzentration beträgt die Hemmmrate nur noch 18 Prozent, bei der doppelten Lindankonzentration verliert das Enzym 42 Prozent seiner Aktivität, bei der dreifachen Lindanzugabe 55 Prozent. Die Hemmmrate erhöht sich signifikant mit steigender Substratkonzentration und steigender Hemmstoffkonzentration.

Bei den nächstgeringeren Substratkonzentrationen zwischen $2 \cdot 10^{-4}$ und $2 \cdot 10^{-5}$ Mol/l verursacht die Lindanzugabe überraschenderweise keinerlei inaktivierenden Effekt. Verringert man die Substratkonzentration noch weiter, so hat die höchste Lindankonzentration wieder eine signifikante Hemmung der Enzymaktivität zur Folge.

Trägt man die Reaktionsgeschwindigkeit der Kontrollversuche gegen den negativen Logarithmus der Substratkonzentration auf (Abb. 8), so wird der Kurvenverlauf nicht sigmoid, sondern man erhält eine stark gekrümmte Kurve, die nach anfänglich sigmoidem Verlauf in einem Hochpunkt gipfelt und wieder zur Abszisse strebt. Unter der Lindaneinwirkung nimmt die maximale Aktivität und die Michaeliskonstante des Enzyms ab. Mit Erhöhung der Lindankonzentration wird die negative Steigung der Kurve steiler, d.h. die Hemmung der Enzymaktivität nimmt zu. Ein ähnliches Verhalten der Enzymaktivität zeigen die Pseudocholinesterasen unter dem Einfluß von Natriumfluorid (GOEDDE et al., 1967).

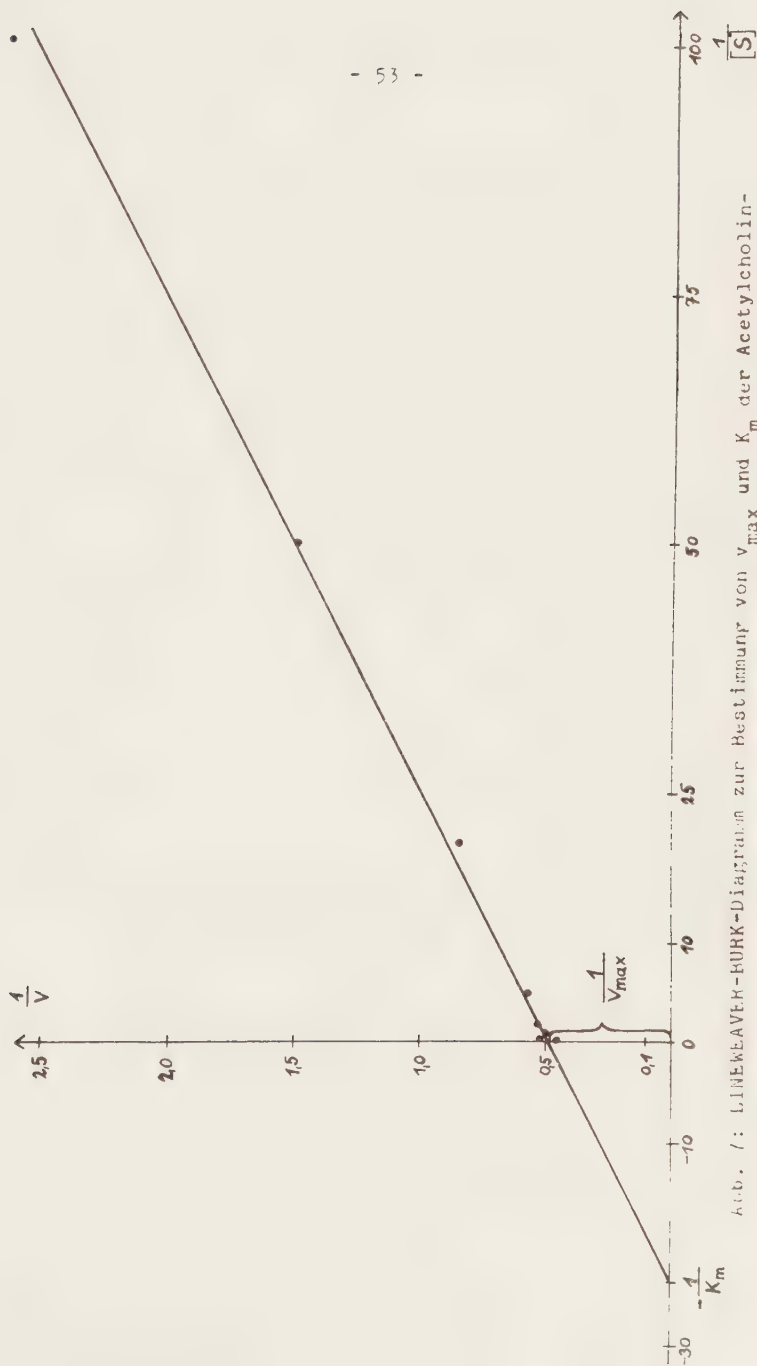


Abb. 1: LINEWEAVER-BURK-Diagramm zur Bestimmung von V_{max} und K_m der Acetylcholinesterase aus dem Gehirnatomenat von Mäusen (v in U/P , $[S]$ in $mMol/l$)

Tabelle 10: Lindaneinfluß auf die Kinetik der Acetylcholinesterase aus dem Gehirnhomogenat von Mäusen (4 ml Cremophor/kg i.v.)

Substratkonzentration [S] in Mol/l

Lindankonzentrationen in Mol/l im Test: $L_1 = 7,6 \cdot 10^{-5}$;

$L_2 = 15,2 \cdot 10^{-5}$; $L_3 = 22,8 \cdot 10^{-5}$

Aktivitätsangaben in mU/g Gehirn, Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Versuchstieren

[S]	Aktivität der Acetylcholinesterase			
	Kontrolle	L_1	L_2	L_3
$5 \cdot 10^{-3}$	2197 ± 40	1437 ± 242*	970 ± 69*	548 ± 93*
$2,5 \cdot 10^{-3}$	1928 ± 70	1577 ± 58*	1129 ± 35*	878 ± 46*
$2 \cdot 10^{-3}$	1769 ± 94	1684 ± 160	1645 ± 99	1649 ± 96
$5 \cdot 10^{-4}$	1179 ± 122	1120 ± 29	1132 ± 118	1086 ± 96
$2 \cdot 10^{-4}$	664 ± 22	680 ± 14	690 ± 36	653 ± 20
$1 \cdot 10^{-4}$	377 ± 16	317 ± 31	308 ± 36	270 ± 29*
$5 \cdot 10^{-5}$	269 ± 15	187 ± 34	165 ± 41	150 ± 29*

* = Unterschied zur Kontrolle mit über 99 % Wahrscheinlichkeit

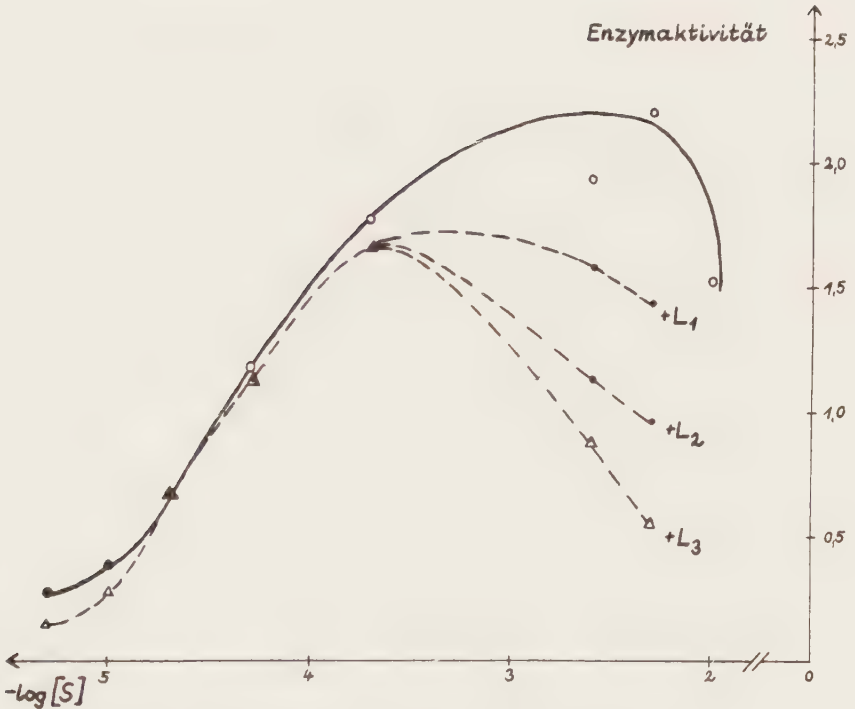


Abb. 8: Hemmeffekt von Lindan auf die Aktivität der Acetylcholinesterase (EC.3.1.1.7) aus dem Gehirn von Mäusen in Abhängigkeit von der molaren Substratkonzentration in vitro

Aktivität in U/g Frischgewicht

Substratkonzentration $[S]$ in Mol/l

Lindankonzentration L_1 im Test: $7,6 \cdot 10^{-5}$ Mol/l

○—○ ungehemmte Reaktion

●—● Reaktion nach Zugabe der ein- (L_1) und zweifachen (L_2) Lindandosis

△—△ Reaktion nach Zugabe der dreifachen (L_3) Lindandosis

4. DISKUSSION

Lindan ist ein Gift mittlerer Toxizität, das in seiner Wirkung beim Säugetier durch einen gewissen Antagonismus gekennzeichnet ist. Nach einmaliger Applikation erzeugt es einerseits heftige Krampfanfälle, andererseits verhindert es die Wirkung bestimmter Krampfgifte und Narkotika. Der Wirkungsverlust verschiedener Pharmaka, der vom dritten bis zum zehnten Tag nach Lindangabe beobachtet wurde, dürfte zum größten Teil auf die Aktivierung der Lebermikrosomenenzyme, die den Abbau dieser Pharmaka katalysieren, zurückzuführen sein (COPER et al., 1951; GHAZAL et al., 1964; KORANSKY et al., 1964).

Die krampfauslösende Lindandosis ist abhängig von der Applikationsart, dem Lösungsmittel und der Tierspezies. Während von KORANSKY und seinen Mitarbeitern (1963) die intraperitoneale Dosis zur Krampferzeugung bei Ratten (1 Std p.a.) mit 80 mg/kg angegeben wird, traten in Vorversuchen zu dieser Arbeit schon 1 - 2 Minuten nach intravenöser Injektion von 10 mg/kg bei Ratten Krämpfe auf, bei Mäusen 30 Sekunden nach i.v.Gabe von 7 mg/kg. Elektroencephalographische Aufzeichnungen bei der Katze zeigten ebenfalls, daß nach i.v.Applikation die relativ niedrige Dosis von 1 - 5 mg/kg innerhalb von 2 Minuten krampferzeugend wirkt (JOY, 1976).

Der fast unmittelbar nach der i.v.Injektion beobachtete Wirkungseintritt des Lindans kann nur die Folge einer sehr schnellen Verteilung des Wirkstoffes vom Blut auf das Zielorgan sein. Die rasche Verbreitung im Organismus wird durch autoradiographische Studien (NAKAJIMA et al., 1970) und durch die Ergebnisse der Blutspiegelkurve bestätigt. Aus dem ermittelten Konzentrationsverlauf des

Lindans im Blut ist ersichtlich, daß 98 Prozent der injizierten Dosis mit einer Halbwertszeit von 45 Sekunden aus dem Blut abgegeben werden. Im Hinblick auf die kurze Zeitspanne zwischen Lindaninjektion und Wirkungseintritt erscheint die Annahme berechtigt, daß das γ -Isomere selbst, und nicht eines seiner Abbauprodukte, der krampfauslösende Wirkstoff ist (JOY, 1976).

Wegen der pharmakologischen Effekte des Lindans lag die Vermutung nahe, daß der primäre Angriffspunkt des Insektizids im Zentralnervensystem zu suchen sei. In Bezug auf die Organanreicherung zeigt Lindan jedoch keine außergewöhnliche Affinität zu Gehirn oder Rückenmark.

Vergleicht man die Lindanverteilung im Organismus mit den Ergebnissen anderer Autoren (DAVIDOW & FRAWLEY, 1951; KORANSKY et al., 1963; NAKAJIMA et al., 1970; SEIDLER et al., 1975), so ergeben sich zum Teil erhebliche Differenzen, die meiner Meinung nach auf Unterschiede in den experimentellen Bedingungen zurückzuführen sein dürften.

Gerade die Arbeiten von SEIDLER und seinen Mitarbeitern (1975) und KORANSKY und Mitarbeitern (1963), die sich am umfassendsten mit der Verteilung von Lindan auf die Organe der Ratte beschäftigt haben, stimmen in der Methodik mit der vorliegenden Arbeit nicht überein. Während SEIDLER die Verteilung des oral verabreichten C14-markierten Lindans nach zehntägiger Vorbehandlung mit dem inaktiven Wirkstoff untersuchte und KORANSKY die Verteilung des C136-markierten Insektizids nach einer einmaligen, intraperitoneal applizierten Dosis ermittelte, befaßt sich diese Arbeit mit der Organverteilung nach einer einmaligen intravenösen Injektion von C14-markiertem Lindan. Zudem können nur die Ergebnisse 1 Tag p.a. diskutiert werden, weil nur zu diesem Zeitpunkt in allen Arbeiten übereinstimmend Untersuchungen durchgeführt wurden.

Tabelle 11: Vergleich der Lindanverteilung auf die Organe der Ratte mit Literaturdaten 24 Stunden nach:

- A einmaliger intraperitonealer Gabe von C136-Lindan (KORANSKY et al., 1963),
- B oraler Gabe von C14-Lindan mit vorausgegangener 10-tägiger Lindanfütterung (SEIDLER et al., 1975),
- C einmaliger intravenöser Gabe von C14-Lindan (Ergebnisse aus vorliegender Arbeit)

ORGAN	Prozentualer Anteil der Gesamtaktivität bei		
	A	B	C
Blut	0,4	0,5	0,3
Herz	0,1	0,1	0,5
Leber	0,9	1,6	3,8
Lunge	0,4	0,1	0,5
Milz	0,3	0,03	0,2
Nieren+Neb.-nieren	0,8	3,8	13,3
Pankreas	-	0,2	0,6
Genitalorgane	1,2	0,1 ^a	1,1
Gehirn+Rückenmark	0,9	0,2 ^b	0,8
Resttier	44,2 ^c	41,4 ^d	51,7 ^e
Kot	4,3	13,8	6,8
Urin	14,7	17,4	13,2
Wiederfund	~68	~79	~93
Muskel/g	0,14	0,06 ^f	0,16
Fett/g	2,24	1,53 ^f	3,1

a) nur Hoden, b) nur Gehirn, c) Fett, Haut, Muskulatur, Skelett, Blut, Magen-Darm-Trakt und Bauchhöhle, d) Fett, Blut, Muskulatur, Schilddrüse, e) Resttier u. Magen-Darm-Trakt, f) aus Blockdiagrammen (ipm) geschätzt

Die von SEIDLER ermittelten Organbelastungen durch Lindan müßten wegen der erhöhten Metabolisierungs- und Ausscheidungsrate nach chronischer Vergiftung (CHADWICK & FREAL, 1972) niedriger sein als die in dieser Arbeit dargestellten Werte (Tab. 2). Auch die verzögerte Resorption über den Magen-Darm-Trakt und die damit verbundenen kinetischen Verhältnisse können zu Unterschieden in der Organverteilung führen. Letzteres trifft auch für die bei KORANSKY angegebenen Daten zu, dürfte aber nicht ausschlaggebend sein, da zu diesem Zeitpunkt die Resorption aus der Bauchhöhle nahezu beendet war. Die Hauptursache für die geringere Organbelastung, besonders von Niere und Leber, liegt wahrscheinlich in der Verwendung des Chlorisotops von Lindan, weil dadurch der quantitative Nachweis der chlorärmeren Metaboliten nicht mehr garantiert werden kann.

In Tabelle 11 sind die zu vergleichenden Daten aus der vorliegenden Arbeit, aus den Mitteilungen von SEIDLER et al. (1975) und aus dem 1963 von KORANSKY und Mitarbeitern veröffentlichten Bericht zusammengestellt.

Wie erwartet, erreicht die Organbelastung in der vorliegenden Arbeit die höchsten Werte, zeigt aber trotz der Verwendung unterschiedlich markierten Lindans größere Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die ohne Adaptation an Lindan ermittelt wurden. Bestätigend für diesen Befund sind die Untersuchungen über die chemische Veränderung des gespeicherten Lindans in den Organen (SEIDLER et al., 1975): Außer in Leber und Blut bestand die in den Geweben vorhandene Radioaktivität zu über 70 Prozent aus unverändertem Lindan. Erst unmittelbar vor der Ausscheidung wird es in der Leber metabolisiert, um danach größtenteils mit dem Blut in die Nieren transportiert zu werden.

Bei einer Gegenüberstellung mit den Werten nach Lindanvorbehandlung zeigt sich sehr deutlich, daß infolge der Stimulierung der Lebermikrosomenenzyme die Metabolisierungs- und Exkretionsvorgänge beschleunigt verlaufen, während die Organbelastung wesentlich niedriger bleibt. Vergleicht man die spezifische Aktivität im Fettgewebe mit 1,5 Prozent der Gesamtaktivität bei SEIDLER und 3,1 Prozent der Gesamtaktivität in dieser Arbeit, so bestätigt sich der von CHADWICK et al. 1971 erbrachte Nachweis, daß die im Fett gespeicherte Radioaktivität 24 Stunden nach einer C14-markierten Lindangabe mit vorausgegangener täglicher Lindanfütterung gegenüber der Speicherung nach einer einmaligen Lindandosis um 50 Prozent reduziert ist.

Besonders auffallend bei den Ergebnissen von SEIDLER ist der hohe Anteil an C14-Aktivität im Kot, der nach einem Tag fast 45 Prozent der Gesamtausscheidungsprodukte ausmacht und sich 3 Tage p.a. in dieser Höhe manifestiert hat. Bei einer Gegenüberstellung mit den von CHADWICK und FREAL (1972) ermittelten Daten von rund 10 Prozent der ausgeschiedenen Aktivität im Kot, - jeweils 24 Stunden nach chronischen und akuten Versuchen, - liegt auch der in den hier durchgeführten Versuchen gefundene Wert von ungefähr 30 Prozent der eliminierten Aktivität noch relativ hoch. Möglicherweise wurde der Wert jedoch durch eine unsaubere Trennung der Exkrete im Stoffwechselkäfig verfälscht.

Abschließend sollen die beachtlichen Unterschiede zwischen den Anreicherungen von radioaktiven Rückständen in den Nieren erörtert werden. Bedingt durch die Funktion der Nieren - Bildung und Konzentrierung des Harns - wird wahrscheinlich ein gewisser Anteil der Radioaktivität auf den in den Nieren enthaltenen Harn zurückzuführen sein. Diese

Annahme könnte eine Erklärung für die unterschiedlich hohe Anreicherung der C14-markierten Verbindungen in den Nieren nach akuter und chronischer Lindanvergiftung bieten: Durch die zehntägige Adaptation mit Lindan in den Versuchen von SEIDLER wird die radioaktive Dosis erst dann dem Körper zugeführt, wenn die Entgiftungs- und Exkretionsvorgänge schon mit maximaler Leistung arbeiten. Es ist daher anzunehmen, daß die Ausscheidung über die Nieren ihren Höhepunkt 24 Stunden p.a. bereits überschritten hat, zumal die C14-Aktivität im Harn in den folgenden zwei Tagen nur um insgesamt 7 Prozent der Gesamtaktivität zunimmt. Einen Tag nach akuter Lindangabe dagegen dürfte sich die renale Exkretion, betrachtet man die gleichbleibende Nierenbelastung zwischen 2 und 24 Stunden p.a., noch in unmittelbarer Nähe ihres Maximums befinden. Der prozentuale Anteil der radioaktiven Abbauprodukte im Harn wäre in diesem Fall natürlich wesentlich höher als zum gleichen Zeitpunkt nach chronischer Lindanverfütterung.

Der äußerst geringe Prozentsatz an Radioaktivität in den Nieren, den KORANSKY angibt, hat möglicherweise seine Ursache in der Verwendung des C136-markierten Lindans und den damit verbundenen Schwierigkeiten bei der Erfassung aller Lindanmetaboliten. Der hier dargestellte hohe Aktivitätsanteil im Harn widerlegt dieses Argument allerdings wieder. In einer nachfolgenden Veröffentlichung über die Elimination von Lindan (KORANSKY et al., 1964) sind jedoch Werte angegeben, die für die oben angeführte Deutung sprechen: Einen Tag nach intraperitonealer Gabe von C136-Lindan können bei nur zögernd anlaufender Chlorid-36-Ausscheidung lediglich 5 Prozent der verabreichten Aktivität im Harn festgestellt werden.

Aus den bisher dargelegten Überlegungen wird deutlich, daß die aus einem Zweikompartimentmodell entwickelte Blutspiegelkurve zwar in der ersten Stunde p.a. dem tatsächlichen Konzentrationsverlauf des Lindans im Blut entspricht, für einen späteren Zeitpunkt aber keine Gültigkeit mehr haben kann, weil das zugrundegelegte Zweikompartimentmodell nicht mit dem Verteilungsschema des Lindans im Organismus übereinstimmt. Wahrscheinlich verteilt sich das Lindan wie andere lipophile Substanzen in einem Dreikompartimentsystem (SCHECHTER & ROTH, 1967), das aus dem Eingangskompartiment (Blut), aus einem intensiv durchbluteten Kompartiment (Leber) und einem langsamer austauschenden Kompartiment (Fettgewebe und Organlipide) besteht. Mit einem solchen Modell (Abb. 9) könnte

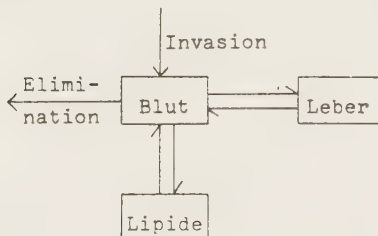


Abb. 9: Hypothetisches Dreikompartimentmodell für die Lindanverteilung im Organismus der Ratte

man die Diffusionsvorgänge zwischen Blut und durchströmten Medium, die wegen der lipophilen Eigenschaften bevorzugte Anhäufung in den Lipiden der Organe und Gewebe, die Mobilisierung des gespeicherten Lindans, den enzymatischen Abbau in der Leber und die Exkretion der Metaboliten erfassen.

Mit den Ergebnissen aus den Untersuchungen der stationären Metabolitkonzentrationen und des Glucose- und Lactatstoffwechsels konnte nachgewiesen werden, daß bestimmte Reaktionen im Organismus nach Lindangabe verändert ablaufen. Wegen der Komplexität der Vorgänge war es jedoch

nicht möglich, einen schlüssigen Beweis für den ursprünglichen Angriffspunkt des Lindans, der die unter Lindaneinfluß veränderte Stoffwechsellage verursacht haben könnte, zu erbringen.

Am auffälligsten waren die erheblichen Stoffwechseleränderungen im Muskel lindanbehandelter Tiere, die sich größtenteils drei Stunden p.a. noch verstärkten. Eine einmalige, gering dosierte Lindangabe hatte im Muskel einen signifikanten Anstieg der Lactat-, Malat- und Citratkonzentration, eine signifikante Abnahme des Pyruvat/Oxalacetatgehaltes und ein kurzfristiges Absinken der Glucosekonzentration zur Folge. Für die Ursache einiger Stoffwechselwirkungen konnte eine Stoffwechselsituation gefunden werden, die den Zusammenhang der unterschiedlichen Reaktionen befriedigend erklärt:

Als Folge der anhaltenden Erregung des Nervengewebes nach Lindangabe treten, je nach Vergiftungsgrad, Muskelzuckungen bis Krampfanfälle auf, die eine extreme Muskelbeanspruchung erfordern. Zur Aufrechterhaltung der Muskelkontraktion wird zusätzliche Energie benötigt, die aus dem anaeroben Abbau von Glucose und der damit verknüpften Mobilisierung des Muskelglykogens gewonnen werden kann. Bei der Glvkolyse entstehen pro Mol Glucose 2 Mol ATP; das hydrierte Nicotinamidnucleotid wird in einer von der Lactatdehydrogenase katalysierten Reaktion mit Pyruvat wieder in seiner oxidierten Form für den Glucoseabbau zur Verfügung gestellt, während sich das Lactat als Endprodukt der Glykolyse anhäuft. Die anfängliche Abnahme des Glucosespiegels im Muskel, verbunden mit der enormen Lactaterhöhung und dem drastischen Absinken des Pyruvat/Oxalacetatgehaltes, dürften daher auf die anaerobe Energiegewinnung des Muskels zurückzuführen sein. Die Verringerung des oxidativen Lactatabbaus im Gesamttier (Tab. 5)

unter Lindaneinfluß und die nach Injektion von C14-Glucose prägnant verstärkte C14-Incorporation ins Leberglykogen lindanbehandelter Tiere (Tab. 7) unterstützen ebenfalls die Hypothese einer anaeroben Stoffwechsellaage im Muskel mit anschließender Glykogenbildung aus dem überschüssigen Lactat und Speicherung des Glykogens in der Leber. Die nach subletaler Lindangabe erhöhte Alaninsynthese aus Glucosemetaboliten in der Leber wird möglicherweise auch durch ein gesteigertes Lactat $\rightleftharpoons$ Pyruvat-Angebot verursacht. Bestätigend für einen erhöhten Glucoseumsatz ist zudem ein Befund von STAREK (1970), nach dem sich die Aktivität der Fructose-1,6-diphosphat-Aldolase im Serum lindanbelasteter Ratten verdoppelt.

Der Anstieg der Malatkonzentration unter Lindaneinfluß im Muskel, das 3 Stunden p.a. plötzlich in nachweisbarer Menge vorhandene Citrat, das Absinken des Oxalacetat/Pyruvatspiegels unter die Nachweisgrenze und die verminderte Glutamatbildung aus Glucosemetaboliten (α -Ketoglutarat) in Muskel, Gehirn und Leber lassen ebenso wie die Störungen im Citrat- und Oxalacetat/Pyruvatgehalt der Leber einen Zusammenhang mit dem Tricarbonsäurezyklus vermuten.

Die auslösende Reaktion für diese Stoffwechselwirkungen des Lindans konnte jedoch nicht gefunden werden, weil einfach zu wenig Daten aus der Literatur über die Kontrolle des Citratzyklus bekannt sind. Wegen der Schwierigkeiten bei der Interpretierung von experimentell verursachten Veränderungen im Gehalt der Zwischenprodukte des Zyklus ist es bis heute noch nicht gelungen, eine befriedigende Regulationstheorie für den Citratzyklus zu entwickeln (NEWSHOLME/START, 1977). Weiterführende Untersuchungen, die sich mit einer Lindanwirkung auf den Turnover von Zwischenprodukten und auf Enzymaktivitäten im Citratzyklus befassen, könnten möglicherweise zur Identifizierung

des ursächlichen Zusammenhangs der gefundenen Stoffwechselwirkungen beitragen.

Bei der Bestimmung der Enzymaktivitäten in vivo überrascht die im Gehirn von Mäusen, 30 Sekunden nach letaler bzw. subletaler Lindandosis, gefundene signifikante Aktivitätsverminderung der Acetylcholinesterase. Bei den in vitro Versuchen konnte nachgewiesen werden, daß der inaktivierende Effekt des Lindans auf das Enzym (Abb. 9) nur bei verhältnismäßig hoher, unphysiologischer AcetylcholinKonzentration auftritt. Dieser Hemmtyp kann weder durch einen kompetitiven Mechanismus erklärt werden, bei dem eine Erhöhung der Substratkonzentration eine geringere Hemtrate zur Folge haben müßte, noch entspricht er einer nichtkompetitiven Hemmwirkung, die unabhängig von der Substratkonzentration ablaufen würde.

Möglicherweise besteht eine Beziehung zu der für die Acetylcholinesterase typische Substratüberschußhemmung (AUGUSTINSSON & NACHMANSON, 1949). Da die insektizide Wirkung des Lindans streng mit der Elektronegativität des in γ -Stellung vorhandenen Substituenten korreliert ist (UCHIDA et al., 1975 b; KISO et al., 1978), könnte Lindan aufgrund seiner räumlichen Konfiguration die Substrathemmung verstärken, wenn es an der selben Stelle wie ein Acetylcholinüberschuß eingreift. In diesem Fall würde eine geringere AcetylcholinKonzentration in der Gegenwart von Lindan ausreichen, um eine Inaktivierung des Enzyms zu erzielen. Bei einer durchschnittlichen AcetylcholinKonzentration von $4,1 \mu\text{g/g}$ im Gehirn normaler Ratten (ELLIOTT et al., 1950; ST. OMER, 1969), entsprechend einer Molarität von rund $3 \cdot 10^{-5}$, könnte die hemmende Wirkung des Lindans jedoch nicht auftreten.

Untersuchungen an Insekten haben gezeigt, daß Lindan eine

Anhäufung von Acetylcholin verursacht, die weit über das normalerweise vorhandene Niveau hinausreicht (WALLER & LEWIS, 1961). An Nervenpräparaten von Insekten konnte weiterhin nachgewiesen werden, daß nach Lindanbehandlung ein einzelner Impuls zu einem Zustand dauernder Erregung führt (NARAHASHI, 1971), der mit Nereistoxin, einem Antagonisten von Acetylcholin unterdrückt werden kann (UCHIDA et al., 1975 a). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Hypothese aufgestellt, daß die Lindanwirkung im Insekt auf einen hohen Acetylcholingehalt zurückzuführen sei, der durch eine übermäßige Freisetzung von Acetylcholin aus der präsynaptischen Membran verursacht wird (UCHIDA et al., 1975 b).

Die Verringerung der Acetylcholinesteraseaktivität nach subletaler Lindangabe in vivo könnte demnach durch zwei sich überlagernde Lindaneffekte verursacht werden: Durch die übermäßige Freisetzung von Acetylcholin aus der präsynaptischen Membran einerseits könnte sich die Acetylcholinkonzentration so weit erhöhen, daß der an die Substratkonzentration gebundene Hemmeffekt von Lindan zur Wirkung kommt. Bis jetzt wurde jedoch nur ein geringfügiger Anstieg des Acetylcholingehaltes unter Lindaneinwirkung im Gehirn von Ratten beobachtet (ST.OMER, 1969). Die Ergebnisse aus intensiver Forschung auf diesem Gebiet könnten vielleicht einen Ansatzpunkt zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus von Lindan bieten.

Mit den in der vorliegenden Arbeit gewählten Untersuchungsmethoden war es möglich, verschiedene signifikante Stoffwechselwirkungen und Einflüsse von Lindan festzustellen. Man kann jedoch nicht mit Sicherheit entscheiden, ob es sich hierbei um primäre Effekte des Insektizides handelt oder um Folgereaktionen auf einen übergeordneten

Vorgang. Um Rückschlüsse auf den primären Angriffspunkt und den Wirkungsmechanismus von Lindan ziehen zu können, müßten die Zusammenhänge der gefundenen Veränderungen unter Lindaneinfluß eindeutiger sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten aber als Ausgangspunkt für eine weiterführende Erforschung der Lindanwirkung dienen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

An Ratten bzw. Mäusen wurde die Verteilung von U-¹⁴C-Lindan und der Einfluß des Insektizides auf verschiedene Stoffwechselvorgänge untersucht.

Nach intravenöser Injektion verteilt sich Lindan, wahrscheinlich durch Diffusion und bevorzugte Lipidlöslichkeit, sehr rasch auf die Organe und Gewebe, so daß 5 Minuten p.a. bereits 95 Prozent der injizierten Dosis aus dem Blut abgegeben sind. In der ersten Stunde p.a. verläuft der Lindanspiegel im Blut nach einer zusammengesetzten Exponentialfunktion mit den beiden Halbwertszeiten $t_1 = 46$ Sekunden und $t_2 = 70$ Minuten.

Bis zu 24 Stunden p.a. reichert sich Lindan am stärksten in den Nieren an. Als nächst höher belastete Organe folgen Fett, Nebennieren, Herz und Rückenmark. In Leber und Gehirn entspricht die Lindananreicherung ab 2 Stunden einer fiktiven Gleichverteilung, in den restlichen Organen reichert sich Lindan nicht an. Die Lindankonzentrationen in Niere, Nebenniere und Herz 24 Stunden p.a. lassen einen Sättigungswert vermuten, während die Lindanausscheidung aus Leber und Gehirn in der gleichen Größenordnung wie die Gesamtelimination verläuft.

Der Einfluß von Lindan (1 mg/kg) auf die stationären Metabolitkonzentrationen bis zu 3 Stunden p.a. ist im Muskel, trotz der geringeren Lindananreicherung, weit ausgeprägter als in der Leber. Die Konzentrationen von Malat und Lactat nehmen im Muskel signifikant zu, bleiben aber in der Leber unverändert. Der Pyruvat/Oxalacetatgehalt sinkt in Leber und Muskel ab, der Citratgehalt ist in beiden Organen erheblichen Schwankungen unterworfen. Der Glucosespiegel nimmt anfangs in Leber und Muskel um 50 Prozent ab. Im Muskel erreicht er seinen Normalwert

3 Stunden p.a. mit "Overshoot", während die Rückkehr zur Norm in der Leber nur zögernd erfolgt. Die freien Aminosäuren bleiben offensichtlich unbeeinflusst.

Der oxidative Lactatabbau nimmt nach 30-minütiger Wirkungszeit von Lindan, trotz erhöhtem Lactatangebot aus dem Muskel, um 25 Prozent ab. Nach einer Lindaneinwirkung von 2 Stunden ist dieser Effekt nur noch in abgeschwächter Form vorhanden.

5 Stunden nach einer subletalen Lindangabe hat sich der Glucoseeinbau ins Leberglykogen um 300 Prozent erhöht, der ins Herzglykogen um 120 Prozent. In Leber und Herz ist außerdem eine vermehrte Glucoseincorporation in die Gruppe der Lipide, Lipoproteine und Niedermolekularen zu verzeichnen. Der Glucoseeinbau in die Proteine bleibt dagegen unbeeinflusst. In der Leber findet jedoch eine leicht gesteigerte Alaninsynthese bei gleichzeitig verminderter Glutamatbildung aus Glucosemetaboliten statt. In Gehirn und Muskel konnte ebenfalls eine verringerte Glucoseincorporation im proteingebundenen Glutamat festgestellt werden.

Die Aktivitäten der respiratorischen Enzyme Cytochrom-oxidase und Succinatdehydrogenase weisen in Leber und Muskel der Ratte nach Lindaninjektion (1 mg/kg) keine signifikanten Unterschiede zum Kontrollkollektiv auf.

Eine krampferzeugende, subletale (7 mg/kg) bzw. letale (36 mg/kg) Lindangabe verursacht im Gehirn von Mäusen eine signifikante Inaktivierung der Acetylcholinesterase. In vitro konnte der hemmende Effekt des Lindans erst bei unphysiologisch hoher Substratkonzentration (2,5 - 5 mM) nachgewiesen werden. Die Hemmung der Acetylcholinesterase in vivo wird möglicherweise durch zwei sich überlagernde Lindaneffekte auf das Acetylcholinssystem verursacht:

1. durch eine forcierte Acetylcholinfreisetzung in der Gegenwart von Lindan und
2. durch eine daraufhin ermöglichte verstärkende Wirkung des Lindans auf die Substratüberschußhemmung der Acetylcholinesterase.

6. LITERATUR

- ALBAUM H.G., TEPPERMAN J. & BODANSKY O. 1946: A spectro-
photometric study of the competition of Methemoglobin
and Cytochrome Oxidase for Cyanide in vitro.
J. Biol. Chem. 163, 641 - 647
- AUGUSTINSSON K.-B. & NACHMANSOHN D. 1949: Distinction
between Acetylcholine-Esterase and other Choline ester-
splitting enzymes.
Science 111, 98 - 99
- BERGMEYER H.U. 1970: Methoden der enzymatischen Analyse.
Band I und II
Verlag Chemie Weinheim, 2. Auflage
- BIEWALD N. & BILLMEIER J. 1978: Blood volume and extra-
cellular space (ECS) of the whole body and some organs
of the rat.
Experientia 34, 412 - 413
- BILLMEIER J. 1977: Blutspiegelverläufe und Organvertei-
lung von ^{14}C -Carboxyl-5-methoxy-4-methylindolsäure (HB 95)
bei der Ratte.
Dissertation Mainz
- CHADWICK L.E. & HILL D.L. 1947: J.Neurophysiol.10, 235
zit. nach DUSPIVA F. 1954, Angew. Chem. 66, 541 - 551
- CHADWICK R.W., CRANMER M.F. & PEOPLES A.J. 1971: Compa-
rative stimulation of γ -HCH metabolism by pretreatment
of rats with γ -HCH, DDT and DDT + γ -HCH.
Toxicol. appl. Pharmacol. 18, 685 - 695
- CHADWICK R.W. & FREAL J.J. 1972: Comparative acceleration
of Lindane metabolism to chlorophenols by pretreatment
of rats with Lindane or with DDT and Lindane.
Fd. Cosmet. Toxicol. 10, 789 - 795

COPER H., HERKEN H. & KLEMPAU J. 1951: Zur Pharmakologie und Toxikologie chlorierter Cyclohexane.

Arch. exper. Path. Pharmacol. 212, 463 - 471

DALLEMAGNE M.J., PHILIPPOT E. & GERNAY J.M. 1948: Recherches sur le mécanisme de l'action centrale de l'hexachlorocyclohexane et de la dibenzylméthylamine chez les animaux supérieurs.

Experientia 4, 155

DAVIDOW B. & FRAWLEY J.P. 1951: Tissue distribution, accumulation and elimination of the isomers of benzene hexachloride.

Proc. Soc. exp. Biol. Med. 76, 780 - 783

DEMOZAY D. & MARECHAL G. 1973 in ULMANN E. 1973: Lindan-Monographie eines insektiziden Wirkstoffs, S. 13 - 22

DÉVÉNYI T. & GERGELY J. 1968: Analytische Methoden zur Untersuchung von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen. Akademische Verlagsgesellschaft Frankfurt/M.

DOST F. H. 1968: Grundlagen der Pharmakokinetik.

Thieme-Verlag Stuttgart, 2.Auflage

DU BOIS K.P. & MANGUN G.H. 1947: Proc. Soc. exp. Biol.

Med. 64, 137, zit. nach DUSPIVA F. 1954

DUSPIVA F. 1954: Zum Wirkungsmechanismus moderner Insektizide.

Angew. Chem. 66, 541 - 551

EBERLEIN W. 1978 in KUTTER E. 1978: Arzneimittelentwicklung, Grundlagen - Strategien - Perspektiven.

Thieme-Verlag Stuttgart

ELLIOTT K.A.C., SWANK R.L. & HENDERSON N. 1950: Effects of anesthetics and convulsants on Acetylcholine content of brain.

Am. J. Physiol. 162, 469 - 474

- ELLMAN G.L., COURTNEY K.D. ANDRES V. & FEATHERSTONE R.M. 1961: A new and rapid colorimetric determination of Acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7, 88 - 95
- GHAZAL A., KORANSKY W., PORTIG J., VOHLAND H.W. & KLEMPAU I. 1964: Beschleunigung von Entgiftungsreaktionen durch verschiedene Insecticide. Naun.-Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharmakol. 249, 1 - 10
- GOEDDE H.W., DOENICKE A. & ALTLAND K. 1967: Pseudocho-
linesterasen. Springer-Verlag Berlin/Heidelberg/New York
- GUTMAN J. & WAHLEFELD A.W. 1970 in BERGMAYER U. 1970: Me-
thoden der enzymatischen Analyse, Band II
- HOHORST H.J. 1970 in BERGMAYER U. 1970: Methoden der en-
zymatischen Analyse, Band II
- JOY R.M. 1976: Convulsive properties of chlorinated hy-
drocarbon insecticides in the cat central nervous system. Toxicol. appl. Pharmacol. 35, 95 - 106
- KISO M., FUJITA T., KURIHARA N., UCHIDA M., TANAKA K. & NAKAJIMA M. 1978: Structure-activity relationship of Lindane analogs. Pestic. Biochem. Physiol. 8, 33 - 43
- KORANSKY W., PORTIG J. & MÜNCH G. 1963: Resorption, Ver-
teilung und Ausscheidung von α - und β -Hexachlorcyclohexan. Naun.-Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharmakol. 244, 564 -575
- KORANSKY W., PORTIG J., VOHLAND H. & KLEMPAU I. 1964: Die Elimination von α - und β -Hexachlorcyclohexan und ihre Be-
einflussung durch Enzyme der Lebermikrosomen. Naun.-Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharmakol. 247, 49 - 60

- MASSEY V. 1959: The microestimation of succinate and the extinction coefficient of Cytochrome c.
Biochim. Biophys. Acta 34, 255 - 256
- METCALF R.L. & MARCH R.B. 1950: Anticholinesterase-activities of organic phosphates.
J. econ. Entom. 43, 670
- MÖLLERING & GRUBER 1970 in BERGMAYER U. 1970: Methoden der enzymatischen Analyse, Band II
- MORRISON P.E. & BROWN A.W.A. 1954: The effects of insecticides on Cytochrome-oxidase obtained from the American Cockroach.
J. econ. Entom. 47, 723 - 730
- MUNK Z.M. & NANTTEL A. 1977: Acute Lindane poisoning with development of muscle necrosis.
Can. Med. A. J. 117, 1050 - 1054
- NAKAJIMA E., SHINDO H. & KURIHARA N. 1970: Whole body autoradiographic studies on the distribution of α -, β -, and γ -BHC- ^{14}C in mice.
Radioisotopes 19, 532 - 538
- NARAHASHI T. 1971: Effects of insecticides on excitable tissues.
Adv. Insect. Physiol. 8, 1 - 93
- SACHS L. 1974: Angewandte Statistik.
Springer-Verlag Berlin/Heidelberg/New York, 4. Auflage
- SAUNDERS L. & NATUNEN T. 1972: A statistical approach to pharmacokinetic calculations.
J. Pharm. Pharmacol. 24, Suppl. 94 P - 99 P
- SCHECHTER P.J. & ROTH L.J. 1967: The distribution of thio-pental in maternal and fetal tissues of the rat.
J. Pharmacol. exp. Ther. 158, 164 - 173

- SCHINDEWOLF U. 1959, Physikalische Kernchemie. Die Wissenschaft Band 114 zit. nach DOST F.H. 1968: Grundlagen der Pharmakokinetik
- SEIDLER H., MACHOLZ R.M., HÄRTIG M., KUJAWA M. & ENGST R. 1975: Untersuchungen über den Metabolismus einiger Insektizide und Fungizide in der Ratte. 4.Mitt. Verteilung, Abbau und Ausscheidung von ^{14}C -markiertem Lindan. Nahrung 19, 473 - 482
- SIEPER H. 1973 in ULMANN E. 1973: Lindan - Monographie eines insektiziden Wirkstoffs, S. 83
- SPECK U. & URICH K. 1970: Das Schicksal der Nährstoffe bei dem Flußkrebs *Oronectes limosus*: II. Resorption U- ^{14}C -markierter Nährstoffe und ihre Verteilung auf die Organe.
Z. vergl. Physiol. 68, 318 - 322
- STAREK A. 1970: Biochemical diagnosis of the poisoning with chlorinated hydrocarbons.
Med. Pracy 21, 554 - 562
- ST.OMER V.V.E. 1972: The effect of some chlorinated hydrocarbons insecticides on biochemical changes in brains of female rats and cockerels.
Diss. Abst. Int. B 32, 4774 - 4775
- UCHIDA M., IRIE Y., FUJITA T. & NAKAJIMA M. 1975 a: Effects of Nereistoxin on the neuroexcitatory action of insecticides.
Pestic. Biochem. Physiol. 5 253 - 257
- UCHIDA M., IRIE Y., KURIHARA N., FUJITA T. & NAKAJIMA M. 1975 b: The neuroexcitatory, convulsive and lethal effects of Lindane analogs on *Periplaneta americana* L.
Pestic. Biochem. Physiol. 5, 258 - 264

ULMANN E. 1973: Lindan - Monographie eines insektiziden Wirkstoffs.

Verlag K. Schillinger Freiburg i. Breisgau

WALLER J.B. & LEWIS S.E. 1961: The effect of γ -BHC and other insecticides on ACh levels in the cockroach.

J. Ins. Physiol. 7, 315 - 323

WEGENER G. & ZEBE E. 1971: Zum Energiestoffwechsel des Gehirns. Eine vergleichende Untersuchung an Vertretern der verschiedenen Wirbeltierklassen.

Z. vergl. Physiol. 73, 195 - 208

ZAKOLODKINA V.I. 1963: Cytochrome oxidase and Succinodehydrogenase activity in tissues of the housefly (*Musca domestica*) after exposure to some insecticides.

J. Hyg. Epid. Microbiol. Imm. 97, 97 - 104

NALIMOV, 1972 in KAISER R. & GOTTSCHALK G., 1972: Elementare Tests zur Beurteilung von Meßdaten.

Bibliographisches Institut Mannheim/Wien/Zürich

Lebenslauf

Am 21. 11. 1945 in Kiel geboren, von 1952 - 1958 Besuch der Volksschule in Obernburg, anschließend Besuch des Deutschen Gymnasiums in Aschaffenburg bis zum Abitur 1965.

Beginn des Biologiestudiums im WS 1965/1966 an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Wechsel zur Christian-Albrechts-Universität Kiel zum WS 1968/1969, Besuch der Johannes Gutenberg-Universität Mainz ab WS 1969/1970.

Vordiplomprüfung im Frühjahr 1969 in Würzburg, Diplomhauptprüfung mit Schwerpunkt Genetik Anfang 1977 in Mainz. Seit 1975 Bearbeitung des vorliegenden Themas am Institut für Zoologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

